

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO CEZAR GREGÓRIO

ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DO SEVELAMER NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL  
CAUSADA POR  
PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)



CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO CEZAR GREGÓRIO

ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DO SEVELAMER NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL  
CAUSADA POR  
PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

CURITIBA

2016

PAULO CEZAR GREGÓRIO

ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DO SEVELAMER NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL  
CAUSADA POR  
PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen.

Coorientador: Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barreto.

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Gregório, Paulo Cezar

Análise *in vitro* do efeito do sevelamer na disfunção endotelial causada por produtos de glicação avançada (AGEs). / Paulo Cezar Gregório. – Curitiba, 2016.

74 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Andréa Emília Marques Stinghen

Coorientador: Fellype de Carvalho Barreto

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Doença renal. 2. Sevelamer. Título II. Stinghen, Andréa Emília Marques. III. Barreto, Fellype de Carvalho. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“Análise *in vitro* do efeito do sevelamer na disfunção endotelial causada por produtos de glicação avançada (AGEs)”**

por

**PAULO CÉZAR GREGÓRIO**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Emilia Marques Stinghen – Presidente**

  
**Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho**

  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aline Borsato Hauser**

**Curitiba, 17 de fevereiro de 2016.**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Silvana e Ilson,

Ao meu padrasto, Sebastião,

Aos meus avós, Diva e Nelson,

Anjos em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus eterno, pelo dom da vida e proteção ao longo dessa trajetória.

À minha família pelo amor, carinho, suporte e compreensão durante esses dois anos. Agradeço especialmente a minha mãe Silvana, ao meu padrasto Sebastião, ao meu pai Ilson e a minha namorada Rafaella.

À minha orientadora Profa. Dra. Andréa Stinghen, por abrir as portas da UFPR para mim, por sempre estar disponível e pronta para ajudar em qualquer adversidade ao longo dessa trajetória. Por sua paciência e dedicação ao trabalho. Um exemplo de profissionalismo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Felype de Carvalho Barreto por seus sábios conselhos e críticas construtivas.

Ao Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza por ter contribuído com o meu crescimento científico e pessoal durante a graduação em Farmácia e por ter me incentivado a seguir na vida acadêmica. Por sua orientação durante esses dois anos e pela amizade.

A todos os colegas do laboratório de Nefrologia Experimental que fazem ou fizeram parte desse trabalho, em especial a Giane, Rayana, Regiane, Bruna, Juliana, Keizian e Valentina, pelos conselhos, críticas e pela amizade.

Aos meus amigos do mestrado, Cristiano, Edson, Maiara e Viviana por estarem presentes nos momentos bons e ruins dessa jornada.

Aos colegas do laboratório de Imunoquímica, especialmente à Profa. Dra. Larissa Alvarenga, Profa. Dra. Juliana de Moura e Alessandra Becker, por suas constantes colaborações.

À Profa. Dra. Almeriane Santos do Laboratório de Hematologia, pela concessão da linhagem celular tumoral U-937 para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki, por sua contribuição na realização de alguns experimentos e por ser uma grande pessoa, um exemplo de simplicidade e humildade.

À Lígia Maria Claro pela auxílio técnico durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Lauro M. Souza, por sua contribuição na realização de alguns ensaios.

A todo pessoal da bioquímica que me ajudaram na manipulação das amostras que foram analisadas, em especial ao Dr. Arquimedes e ao Bernardo.

À secretária da pós-graduação, Luciana Marques, por sua disponibilidade em ajudar em todas as questões administrativas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e por subsidiar a aquisição de insumos por meio de verba distribuída ao Programa de Pós-Graduação.

Agradeço.



## EPÍGRAFE

*Todos querem o perfume das flores,  
mas poucos sujam as suas mãos para cultivá-las.*

*(Augusto Cury)*

*O gênio se compõe de dois por cento de talento e 98% de perseverante  
aplicação ao trabalho.*

*(Ludwig Van-Beethoven)*

## RESUMO

Os produtos de glicação avançada (AGEs) são toxinas urêmicas com vários efeitos deletérios no organismo, envolvidos na disfunção endotelial e doença cardiovascular em pacientes com doença renal crônica (DRC). No presente trabalho, investigou-se *in vitro* em células endoteliais humanas, a capacidade de ligação dos AGEs ao Sevelamer, como possível estratégia terapêutica. Desta forma utilizou-se o receptor para AGEs (RAGE) e a interleucina-8 (IL-8) como biomarcadores de disfunção endotelial. Os AGEs foram preparados por glicação da albumina e caracterizados por absorbância e eletroforese em gel de poliacrilamida. Os níveis de endotoxinas dos AGEs sintetizados, foram mensurados pelo método de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). As amostras apresentam-se livres de endotoxinas. Células endoteliais humanas foram incubadas em meio de cultura contendo AGEs (0,2 mg/mL) com ou sem Sevelamer (3%). O efeito dos AGEs sobre a viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio de MTT. Realizou-se o ensaio de ressonância magnética nuclear (RMN), em sobrenadante celular contendo fosfato (Pi), a fim de validar o efeito quelante *in vitro* do Sevelamer sobre o Pi. Da mesma forma, os níveis de IL-8 foram analisados no sobrenadante por meio do ELISA. A expressão de RAGE foi avaliada por imunocitoquímica e *Western blot*. A propriedade quimiotática do sobrenadante celular após a exposição aos AGEs com ou sem Sevelamer, foi avaliada em monócitos humanos (Células U-937) usando o ensaio de migração com auxílio da câmara de Boyden. A exposição aos AGEs não afetou a viabilidade celular, mas induziu significativamente a expressão de RAGE quando comparados com as células controle ( $P < 0,005$ ); ainda, a expressão de RAGE diminuiu após tratamento com Sevelamer em relação ao tratamento somente com AGEs ( $P < 0,05$ ). O Sevelamer diminuiu significativamente os níveis de Pi, confirmando sua propriedade *in vitro*. Os níveis de IL-8 aumentaram significativamente após 6h de tratamento com AGEs quando comparado ao controle ( $17,14 \pm 3,1$  vs  $8,2 \pm 1,0$  pg/mL;  $P < 0,005$ ); enquanto um aumento significativo foi observado nos níveis de IL-8 quando comparado as células tratadas somente com AGEs em relação com AGEs mais Sevelamer ( $17,14 \pm 3,1$  vs  $27,6 \pm 2,2$  pg/mL;  $P < 0,05$ ). Quando os AGEs foram adicionados no meio de cultura, o sobrenadante de células endoteliais induziu a quimiotaxia de monócitos ( $402,3 \pm 163,8\%$ ;  $P < 0,05$ ), que foi reduzido ( $402,3 \pm 163,8$  vs  $33,3 \pm 7,4\%$ ;  $P < 0,05$ ) após o tratamento com Sevelamer. O tratamento com Sevelamer reduziu a expressão de RAGE e migração de monócitos e aumentou a expressão de IL-8, uma interleucina descrita como anti-inflamatória, que hipoteticamente pode levar a diminuição de moléculas de adesão. Nossos resultados sugerem que o Sevelamer é capaz de se ligar a outras toxinas urêmicas além do Pi, tais como os AGEs. Esse efeito pleiotrópico pode contribuir para a proteção do endotélio, entretanto experimentos adicionais são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à disfunção endotelial mediada por AGEs e o potencial papel protetor do Sevelamer.

**Palavras-chave:** Doença renal crônica, disfunção endotelial, AGEs, Sevelamer, IL-8 e RAGE.

## ABSTRACT

Advanced glycation end products (AGEs) are uremic toxins with several pro-inflammatory effects, which have been implicated in the development of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in patients with chronic kidney disease (CKD). We sought to investigate the in vitro AGEs-binding capacity of Sevelamer, as a potential anti-inflammatory strategy, using human endothelial cells. For this purpose we chose the receptor for AGE (RAGE) and the interleukin-8 (IL-8) as biomarkers of endothelial dysfunction. The AGEs were prepared through the method of albumin glycation and characterized by absorbance and polyacrylamide gel electrophoresis. The AGEs endotoxin levels were measured through the *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) method. The samples were free of endotoxins. The human endothelial cells were incubated in a culture media containing AGEs (0.2 mg/mL) with or without Sevelamer (3%). The effect of AGEs on cell viability was assessed by MTT assay. A nuclear magnetic resonance (NMR) to measure the levels of phosphate in samples, was performed in order to verify Sevelamer's phosphate binder function in vitro. In addition, IL-8 levels were analyzed in cell supernatant, through enzyme linked immunosorbent assay. RAGE expression was evaluated through immunocytochemistry and Western blot. The chemotactic property of the endothelial cell supernatant after exposure to AGEs, with or without Sevelamer, was evaluated in human monocytes (U-937 cells) using Boyden chamber migration assay. Although the AGEs exposure did not affect the cell viability, it induced significantly RAGE expression when compared to control cells ( $P<0.005$ ); moreover RAGE was significantly decreased after the Sevelamer treatment, if compared to the treatment with AGEs ( $P<0.05$ ). The Sevelamer significantly decreased phosphate levels, therefore confirming its property in vitro. IL-8 levels significantly increased after 6h AGEs treatment when compared to control cells ( $17.14 \pm 3.1$  vs  $8.2 \pm 1.0$  pg/mL;  $P<0.005$ ); while a significant increase was observed in IL-8 levels in cells treated only with AGEs when compared to the treatment of AGEs with Sevelamer ( $17.14 \pm 3.1$  vs  $27.6 \pm 2.2$  pg/mL;  $P<0.05$ ). When AGEs were added to the culture media, the endothelial cell supernatant induced significantly monocytes chemotaxis ( $402.3 \pm 163.8\%$ ;  $P<0.05$ ) which was significantly reduced ( $402.3 \pm 163.8$  vs  $33.3 \pm 7.4\%$ ;  $P<0.05$ ) after the Sevelamer treatment. The Sevelamer reduces RAGE expression and monocytes migration, while increasing IL-8 expression, an interleukin described as anti-inflammatory, which hypothetically could lead to the decrease in adhesion molecules. Our results suggest that the Sevelamer is capable of binding to other uremic toxins besides phosphate, such as the AGEs. This pleiotropic effect may contribute to its role on the endothelium protection. Additional experiments are necessary for a better understanding of the mechanisms related to the AGEs mediated endothelial dysfunction and the Sevelamer potential protective role.

**Keywords:** Chronic kidney disease, endothelial dysfunction, AGEs, Sevelamer, IL-8 e RAGE.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1–Formação de AGEs a partir da reação de Maillard .....	21
Figura 2–Efeitos intracelulares dos AGEs após ligação com RAGEs em células endoteliais .....	24
Figura 3–Estrutura química do Sevelamer .....	25
Figura 4–Migração de monócitos através do endotélio vascular.....	28
Figura 5–Câmara de Boyden .....	39
Figura 6–Ilustração esquemática do processo de migração através da câmara de Boyden .....	40
Figura 7–Absorbâncias encontradas nas soluções de AGEs e BSA.....	41
Figura 8– Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) .....	42
Figura 9– Avaliação da viabilidade celular após exposição ao BSA e AGEs .....	43
Figura 10–Efeito do Sevelamer nas amostras com Pi, nas concentrações de 1 e 4 mM com e sem Sevelamer.....	44
Figura 11–Efeito do BSA e AGEs na coloração por imunocitoquímica para RAGE ..	45
Figura 12–Efeito dos AGEs sobre a expressão de RAGE em células endoteliais ....	46
Figura 13–Efeito dos AGEs na expressão de IL-8 em células endoteliais .....	47
Figura 14–Efeito de sobrenadantes de células endoteliais na migração de monócitos .....	48

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1–Estadiamento da DRC.....	18
Tabela 2–Quantificação de proteínas totais nas amostras de BSA e AGEs .....	42
Tabela 3–Absorbâncias das amostras de BSA e AGEs .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	–	Produtos finais de glicação avançada
b-FGF	–	<i>Basic fibroblast growth factor-human</i>
BSA	–	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CML	–	N <sup>E</sup> -(carboximetil)lisina
CKD-EPI	–	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
Da	–	Daltons
DCV	–	Doença cardiovascular
DRC	–	Doença renal crônica
ECGF	–	<i>Endothelial cell growth factor</i>
EDTA	–	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	–	<i>Enzyme linked absorbent assay</i>
FGF-23	–	<i>Fibroblast growth factor 23</i>
HUVECs	–	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
HD	–	Hemodiálise
ICAM-1	–	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-1	–	<i>Interleukin-1</i>
IL-6	–	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	–	<i>Interleukin-8</i>
Ig	–	Imunoglobulinas
LFL-L	–	Polipeptídeo ligante do RAGE
LAL	–	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
M	–	Molar
MG	–	Metilglioxal
MCP-1	–	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
N	–	Número total de amostras analisadas
nm	–	Nanômetros
NO	–	<i>Nitric oxide</i>
Pi	–	Fosfato inorgânico
PBS	–	Tampão fosfato salino
PCR	–	Proteína C reativa
PDG	–	Produtos de degradação da glicose

PKC- $\beta$	–	Proteína quinase C (isoforma beta)
PMSF	–	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
RAGEs	–	<i>Receptors for advanced glycation end products</i>
ROS	–	<i>Reactive oxygen species</i>
sRAGE	–	Receptor for Advanced Glycation End Products
SBN	–	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SFB	–	Soro fetal bovino
VCAM-1	–	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
SMC	–	<i>smooth muscle cell</i>
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	18
2.2 TOXINAS URÊMICAS.....	19
2.3 AGEs.....	20
2.4 RAGEs .....	23
2.5 SEVELAMER .....	25
2.6 INTERLEUCINA 8 E QUIMIOTAXIA .....	27
2.7 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA DIMINUIÇÃO DE AGEs .....	29
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>5 METODOLOGIA .....</b>	<b>33</b>
5.1 MATERIAL .....	33
5.2 MÉTODOS .....	33
5.2.1 Cultura Celular .....	33
5.2.2 Síntese e Caracterização dos AGEs .....	34
5.2.3 Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.....	35
5.2.4 Dosagem de endotoxinas.....	35
5.2.5 Viabilidade celular .....	35
5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	36
5.2.7 Avaliação da expressão de RAGE por imunocitoquímica .....	36
5.2.8 Avaliação da expressão de RAGE por <i>Western blot</i> .....	37



5.2.9 Avaliação da expressão de IL-8 por ELISA .....	38
5.2.10 Ensaio de migração celular .....	38
5.2.11 Análise estatística .....	40
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS AGEs.....	41
6.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	42
6.3 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS .....	42
6.4 VIABILIDADE CELULAR.....	43
6.5 RMN .....	44
6.6 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE RAGE .....	45
6.7 ANÁLISE POR <i>WESTERN BLOT</i> PARA DETECÇÃO DE RAGE.....	45
6.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-8 POR ELISA .....	46
6.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	47
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>9 ENSAIOS ADICIONAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em estágios avançados da doença renal crônica (DRC), grande parte dos pacientes é acometida por várias complicações, tais como a disfunção endotelial e a calcificação vascular, levando a doença cardiovascular (DCV) (OLIVEIRA *et al.*, 2010a). Com a progressão da DRC, os rins perdem a capacidade de remover as toxinas urêmicas da circulação sanguínea, ocorrendo acúmulo destas toxinas, envolvidas frequentemente na inflamação sistêmica no organismo, atingindo o endotélio vascular e dessa forma induzindo ao desenvolvimento da DCV (BARRETO *et al.*, 2014; STINGHEN; PECOITS-FILHO, 2011; VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). De fato, a exposição do endotélio a estas toxinas, leva a modificações no fenótipo celular, fazendo com que as células endoteliais respondam com a produção de moléculas pró-inflamatórias (DIAZ-BUXO; WOODS, 2006; SEGAL; BAYLIS; JOHNSON, 2006).

Os AGEs compreendem um grupo heterogêneo de proteínas ou lipídeos, modificados por meio de reações não enzimáticas de glicação, e oxidados após contato com açúcares. A partir do momento que são formados, os AGEs tornam-se estruturas irreversíveis. Foi demonstrado que os AGEs acumulam-se na parede dos vasos, com efeitos deletérios tanto no âmbito micro quanto macrovascular, afetando a estrutura e a função celular. Os AGEs podem modificar a matriz extracelular, a ação de citocinas e radicais livres por meio da ligação com receptores da superfície celular (GOLDIN *et al.*, 2006). No sistema cardiovascular, seu acúmulo contribui para o enrijecimento das artérias, anormalidades miocárdicas, formação da placa aterosclerótica e disfunção endotelial. Quando os AGEs se ligam ao colágeno e elastina (responsáveis por grande parte da elasticidade vascular), acumulam-se na matriz dos vasos de forma desordenada e não funcional. Ainda, alteram a modulação endotelial, o tônus vasomotor, a adesão plaquetária, a tonusogenicidade e a proliferação celular (ZIEMAN; KASS, 2004).

Os AGEs exercem tais ações no sistema vascular através da ligação a seus receptores, principalmente o RAGE (CHAWLA *et al.*, 2014; REMPEL *et al.*, 2015; STINGHEN *et al.*, 2015). A ativação do RAGE induz a resposta inflamatória, levando aos efeitos descritos acima e ainda, por exemplo, ao aumento da produção de

moléculas de adesão, aumento da proliferação da camada íntima do vaso, angiogênese e estresse oxidativo. Células endoteliais expostas às altas concentrações de AGEs diminuíram significativamente a viabilidade celular (CHEN *et al.*, 2015). Além disso, a associação entre AGEs-RAGE eleva o risco de doença cardíaca e mortalidade (MARUTHUR *et al.*, 2015; SELVIN *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2010).

A interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina expressa por vários tipos de células incluindo monócitos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos, sendo sua principal característica a quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão induzindo a adesão e a transmigração através do endotélio (CAMPBELL; MAXWELL; WAUGH, 2013; LIU; DAI; ZHOU, 2015). Além disso, a IL-8 estimula outras células para realizar fagocitose, aumentando assim a eficiência de reparação de tecidos. Ainda, induz à reorganização do citoesqueleto, alterações nos níveis de cálcio intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares e o *burst* respiratório (GIMBRONE *et al.*, 1989; JUNDI; GREENE, 2015).

O Sevelamer é um medicamento muito utilizado na prática clínica para controlar os níveis de fosfato sérico (Pi) em pacientes com DRC em diálise. É um polímero catiônico que se liga ao Pi, sendo que sua estrutura apresenta várias aminas espaçadas por moléculas de carbono. No intestino, as aminas ligam-se a prótons e interagem com o ânion Pi por meio de carga e ligação com hidrogênio (CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002; COPPOLINO *et al.*, 2015). Além do Pi, liga-se a outras substâncias no intestino onde diminui a absorção de lipídios, ácido úrico e possui efeito anti-inflamatório, sendo considerado um agente protetor do sistema cardiovascular. Estudos recentes têm demonstrado que o Sevelamer pode estar associado com a diminuição da progressão de calcificações das artérias aórticas e coronárias, em comparação com o quelante à base de cálcio (ASMUS *et al.*, 2005; BLOCK *et al.*, 2005a; CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002; KAKUTA *et al.*, 2011; SIX *et al.*, 2012), embora esses achados não tenham sido repetidos em outros estudos (BARRETO *et al.*, 2008).

Toxinas urêmicas, tais como os AGEs, podem se ligar ao Sevelamer que não é absorvível pelo intestino. Em estudo envolvendo pacientes em hemodiálise (HD) com diabetes tipo 2, verificou-se que a administração de Sevelamer durante três

semanas, não só reduziu os níveis circulantes de AGEs em geral, mas também os níveis de carboximetilisina (CML) e metilglioxal (MG) e levou a mudanças nos níveis séricos de Pi, lipídios, marcadores inflamatórios, e *reactive oxygen species* (ROS). Além disso, verificou-se diminuição na expressão de VCAM-1, um marcador de lesão vascular (VLASSARA *et al.*, 2012a; YUBERO-SERRANO *et al.*, 2015). Todavia, já foi demonstrado em estudos envolvendo pacientes com nefropatia diabética, que o Sevelamer diminuiu significativamente o *Fibroblast growth factor 23* (FGF-23) e aumentou os níveis circulantes de Klotho (LIN *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2010b; VLASSARA *et al.*, 2012a).

O presente estudo teve como objetivo investigar *in vitro* os mecanismos envolvidos no efeito pleiotrópico do Sevelamer, como quelante de AGEs, o que hipoteticamente de forma translacional reduzir a resposta inflamatória vascular nos pacientes com DRC e consequentemente auxiliar na terapêutica destes pacientes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A DRC caracteriza-se por lesão ou comprometimento funcional nos rins por um tempo igual e/ou superior a três meses, acompanhada de albuminúria ou proteinúria (BERMÚDEZ *et al.*, 2011). A função renal é comumente avaliada por meio da medida da taxa de filtração (TFG). A TFG estimada (TFGe) pode ser calculada por fórmulas matemáticas que se baseiam em fatores étnicos, gênero, idade e na própria creatinina sérica. Atualmente, a equação CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) é considerada a que estima a taxa de filtração com maior acurácia (LEVEY *et al.*, 2009). Com base na TFG, é possível classificar a DRC em seis estádios (1, 2, 3A, 3B, 4 e 5) e em três fases de proteinúria (1, 2, e 3), com os estágios iniciais representando valores normais e estágios mais elevados, refletindo doença mais severa (Tabela 1) (ECKARDT *et al.*, 2013; GANSEVOORT *et al.*, 2013; INKER *et al.*, 2014; KDIGO, 2013).

Tabela 1—Estadiamento da DRC

<b>Estádio</b>	<b>Descrição</b>	<b>TFG (mL/min/1,73m<sup>2</sup>)</b>
<b>1</b>	Dano renal sem alteração da função renal	≥ 90
<b>2</b>	Dano renal com alteração leve da função renal	89 a 60
<b>3a</b>	Perda leve a moderada da função renal	59 a 44
<b>3b</b>	Perda moderada a grave da função renal	44 a 30
<b>4</b>	Perda grave da função renal	29 a 15
<b>5</b>	Insuficiência renal	≤ 15

Fonte: KDIGO, 2013.

A DRC é uma doença em crescimento exponencial, e juntamente com outras doenças crônicas não transmissíveis, é responsável por 25 milhões de mortes ao ano, tendo como principal causa de morte as complicações relacionadas às doenças cardiovasculares (DCV), principalmente a aterosclerose (EL NAHAS, 2010). Nos pacientes com DRC submetidos à terapia de substituição renal (diálise), a morte por DCV é cinco vezes maior que na população em geral, mesmo após estratificação para idade, sexo, raça e diabetes (MEIJERS *et al.*, 2010). Pacientes em hemodiálise apresentam uma expectativa de vida cinco vezes menor quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma idade (ARSOV *et al.*, 2013). Atualmente no Brasil, estima-se que existam mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, sendo que aproximadamente 98 mil encontram-se em diálise (SESSO *et al.*, 2014).

## 2.2 TOXINAS URÊMICAS

Com a progressão da DRC, os rins perdem a capacidade de remover efetivamente compostos tóxicos da corrente circulatória para consequente formação da urina, resultando em seu acúmulo no organismo. O acúmulo destas “toxinas urêmicas” é responsável por muitas das consequências clínicas de uma condição conhecida como uremia (BARRETO *et al.*, 2014; GLASSOCK, 2008; HIMMELFARB, 2009). Essas toxinas urêmicas podem ser definidas como solutos que produzem efeitos deletérios no organismo. Tais toxinas representam grande relevância na pesquisa científica, pois tem sido apontadas como grandes responsáveis pela comorbidade inflamatória vascular na síndrome urêmica (PIRODDI *et al.*, 2013).

Entre os efeitos tóxicos da uremia, o dano cardiovascular é um dos principais responsáveis pela elevada morbimortalidade neste grupo de pacientes, mesmo em estágios precoces da DRC. É interessante perceber que muitos desses efeitos, tais como inflamação e anemia, também têm impacto relevante sobre o *status* cardiovascular (VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008).

Já foram identificados mais de 150 compostos urêmicos (EuTox, <http://www.uremic-toxins.org/>), que são classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise em:

- Compostos pequenos solúveis em água com no máximo 500 Da, que têm como protótipos moléculas como ureia e creatinina, que são facilmente removidas por diálise. Os compostos neste grupo não têm necessariamente uma toxicidade funcional;
- Compostos de peso molecular moderado com mais de 500 Da. Os protótipos deste grupo são  $\beta$ 2-microglobulina e leptina. Essas moléculas só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir sua passagem através da membrana. Muitos dos compostos neste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas. Os AGEs estão alocados nesse grupo de classificação.
- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os protótipos deste grupo são os fenóis e os indóis, compostos difíceis de remover por diálise e com diversas atividades tóxicas no organismo.

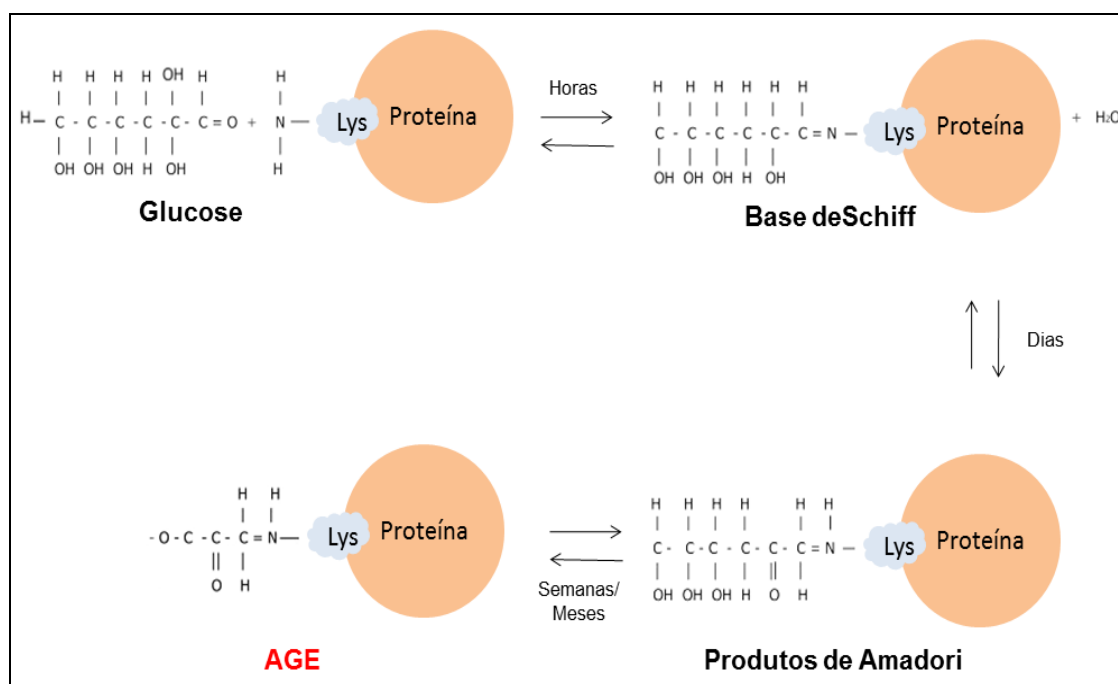
Os solutos de tamanho médio e os ligados à proteína têm sido alvo de grande interesse, pois não passam através dos filtros de diálise. Dessa forma, a natureza da toxina e sua característica de remoção por diálise resultam em diferentes padrões patofisiológicos (VANHOLDER, 2011; PIRODDI *et al.*, 2013).

## 2.3 AGEs

Os AGEs consistem num grupo heterogêneo de proteínas ou lipídeos modificados, por meio de reações não enzimáticas de glicação, e oxidados após contato com açúcares aldose. Eles são derivados de grupamentos aldeídos e cetonas de carboidratos que reagem com grupos amino primários de aminoácidos livres ou proteínas para formar uma base de Schiff. Depois do rearranjo dos produtos (produtos de Amadori) são formados os AGEs, que na presença de metais de transição são oxidados e tem sua formação acelerada. A partir do momento que são formados, os AGEs tornam-se estruturas irreversíveis. Como já mencionado, os

AGEs englobam um grupo de diversos tipos de moléculas glicadas, porém o produto mais prevalente *in vivo* é o N<sup>E</sup>-(carboximetil)lisina, mais conhecido como CML (BODIGA; EDA; BODIGA, 2013; GOLDIN *et al.*, 2006; HEGAB, 2012). Os mecanismos alternativos de formação de AGEs incluem a chamada via do “estresse carbonílico”, na qual a oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos. A glicólise e a autooxidação de glicose, por exemplo, produzem metilglioxal e glioxal, que interagem com aminoácidos para formar AGEs (HUEBSCHMANN *et al.*, 2006; MEADE; MILLER; GERRARD, 2003). O processo de formação dos AGEs é ilustrado na figura a seguir (Figura 1).

Figura 1—Formação de AGEs a partir da reação de Maillard



Fonte: Adaptado de Hegab *et al.* 2012.

Os humanos estão expostos a duas fontes principais de AGEs: a exógena (via alimentar) e a endógena (formados no organismo). Alimentos com alto índice de proteínas (carnes, queijos e ovos) são muito ricos em AGEs, ao contrário do grupo dos carboidratos, que apresenta menor quantidade dessa molécula (GOLDIN *et al.*, 2006). Os AGEs também podem ser formados durante o processamento de



alimentos industrializados, por serem manipulados em altas temperaturas. Por via endógena, a maior formação de AGEs ocorre quando o organismo é exposto a altos níveis de glicose como, por exemplo, nos pacientes diabéticos, no envelhecimento e na uremia (BUCALA, 2014; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010). A principal forma de excreção dos AGEs é através da urina (THORNALLEY; RABBANI, 2009). Pacientes renais crônicos em diálise peritoneal são altamente susceptíveis a formação sistêmica e local de AGEs, como resultado da uremia e também da constante exposição do peritônio a altos níveis de produtos de degradação de glicose (PDG) gerados durante a esterilização por meio do calor do fluído de diálise. Os PDG presentes no fluído de diálise peritoneal são absorvidos pela rede de capilares peritoneal de onde passam para a corrente sanguínea, o que leva ao aumento das concentrações de AGEs circulantes (ALHAMDANI; AL-AZZAWIE; ABBAS, 2007). Outro fator que contribui para a elevada concentração de AGEs na uremia é o aumento do estresse oxidativo, gerado por um desequilíbrio nos níveis de glutathione oxidada e glutathione reduzida, e alterações no sistema antioxidante (tais como a superóxido desmutase/peroxidase). Compostos carbonílicos formados por meio de mecanismos não-oxidativos podem gerar um aumento na formação de AGEs (MEERWALDT *et al.*, 2009; STINGHEN *et al.*, 2015).

Tomando-se por base a classificação atual de toxinas urêmicas, os AGEs são consideradas toxinas de tamanho médio (maiores que 500 Da) que não são removidas facilmente através do tratamento dialítico, pois sua remoção requer a utilização de membranas de diálise com poros de maior diâmetro (VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). Foi demonstrado que os AGEs acumulam-se na parede dos vasos, causando efeitos deletérios tanto no âmbito micro quanto macrovascular, afetando a estrutura e a função das células. Os AGEs podem modificar a matriz extracelular, a ação de citocinas e radicais livres através da ligação com receptores da superfície celular (GOLDIN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2014).

No sistema cardiovascular, seu acúmulo contribui para o enrijecimento das artérias, anormalidades miocárdicas, na formação da placa aterosclerótica e na disfunção endotelial. Quando estas moléculas se ligam ao colágeno e à elastina (responsáveis por grande parte da elasticidade vascular), acumulam-se na matriz dos vasos de forma desordenada e não funcional. Ainda, alteram a modulação

endotelial, o tônus vasomotor, a adesão plaquetária, a tonusgenicidade e a proliferação celular (ZIEMAN; KASS, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que células endoteliais expostas a altas concentrações de AGEs diminuíram significativamente a viabilidade celular (CHEN *et al.*, 2015).

## 2.4 RAGEs

Os AGEs exercem tais ações no sistema vascular, ligando-se a seus receptores, principalmente os *Receptors for Advanced Glycation End-Products* (RAGEs) (CHAWLA *et al.*, 2014; REMPEL *et al.*, 2015; STINGHEN *et al.*, 2015). Os RAGEs são multiligantes transmembrânicos inespecíficos para AGEs, que pertencem a superfamília de imunoglobulinas (Ig) de receptores de superfície celular (TAM *et al.*, 2011).

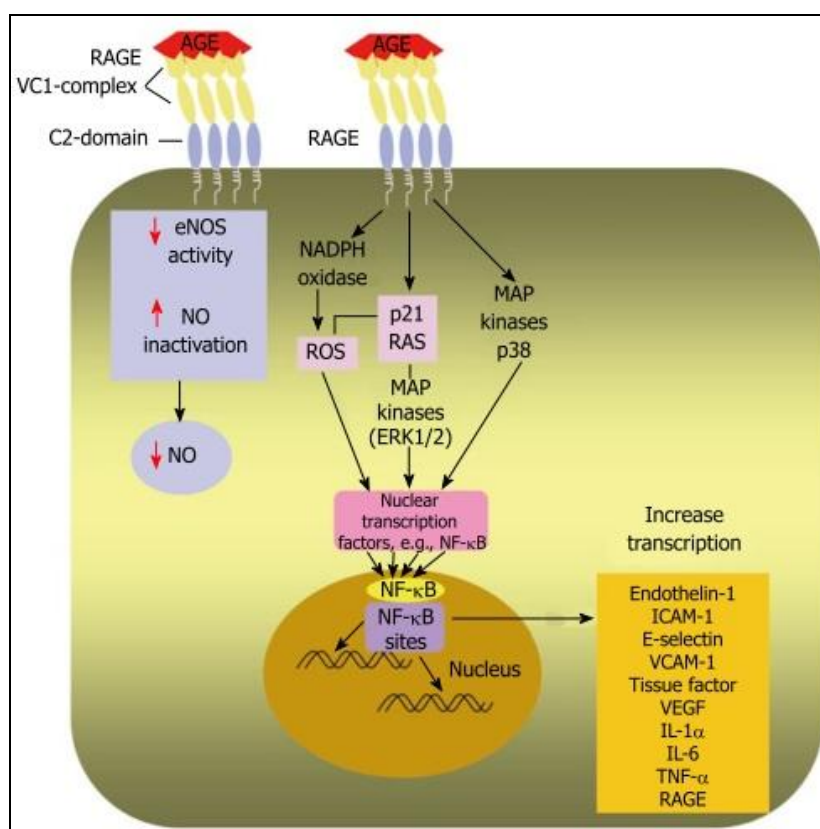
Os RAGEs podem ser ligados com outro polipeptídeo, chamado polipeptídeo ligante do RAGE (LFL-L), por meio de ligação não covalente ao seu domínio extracelular. O LFL-L, por sua vez, estabelece a ligação com os AGEs. Geralmente, há uma baixa expressão de RAGE em tecidos. No entanto, ela é aumentada, principalmente, na presença exacerbada de AGEs, como no caso da diabetes ou envelhecimento. Os RAGEs estão presentes, por exemplo, em células endoteliais, células de músculo liso e fagócitos mononucleares na vasculatura diabética, as quais ainda podem ser induzidas a expressá-los em situações onde seus ligantes e/ou fatores de transcrição se acumulam (GOLDIN *et al.*, 2006; HEGAB, 2012). Desta forma, pode-se levantar a hipótese que ao se limitar a expressão de RAGEs nas células vasculares, a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios poderia ser diminuída, prevenindo o desenvolvimento da disfunção endotelial (FIGAROLA *et al.*, 2007).

Os RAGEs também existem na forma solúvel (sRAGE), conforme previamente descrito em humanos e modelo murino. Possuem isoformas que são formadas por dois processos distintos: *splicing* alternativo ou por clivagem proteolítica mediada por metaloproteínases e desintegrinas. sRAGE tem emergido como um potencial biomarcador de doenças cardiovasculares. Alguns estudos têm

demonstrado uma associação entre níveis aumentados de sRAGE e alta incidência de doenças cardiovasculares (COLHOUN *et al.*, 2011; MARUTHUR *et al.*, 2015).

A ligação AGE-RAGE causa disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo e estimula a liberação de agentes pró-inflamatórios e pró-coagulantes. A ativação de RAGE por AGEs é a principal causa patogênica de complicações vasculares em pacientes diabéticos (MARCOVECCHIO; LUCANTONI; CHIARELLI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Essa interação induz a resposta inflamatória, levando aos efeitos descritos acima e ainda, por exemplo, ao aumento da produção de moléculas de adesão, aumento da proliferação da camada íntima do vaso, angiogênese e estresse oxidativo. Ademais, a associação entre AGEs-RAGE eleva o risco de doença cardíaca e mortalidade (Figura 2) (MARUTHUR *et al.*, 2015; SELVIN *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2010).

Figura 2—Efeitos intracelulares dos AGEs após ligação com RAGEs em células endoteliais



Fonte: HEGAB *et al.*, 2012.

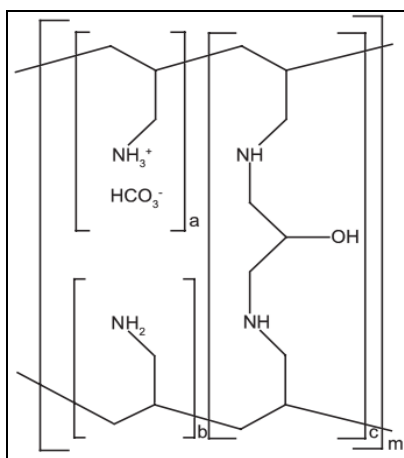
Nota: A interação de AGEs com seus receptores (RAGEs) na superfície endotelial conduz a transdução de uma cascata de sinalização, ativando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) e aumentando a produção de ROS. Essa ligação também desencadeia uma cascata inflamatória, diminuindo a disponibilidade de óxido nítrico (NO) na célula. A etapa principal

dessas sinalizações dá-se na ativação da via NF- $\kappa$ B e a sua translocação para o núcleo, aumentando a transcrição de genes-alvo de moléculas pró-inflamatórias, como endotelina-1 e ICAM-1.

## 2.5 SEVELAMER

O Sevelamer é um medicamento muito utilizado na prática clínica para controlar os níveis de Pi em pacientes com DRC em diálise. É um polímero catiônico sem alumínio e cálcio que se liga ao Pi (Figura 3). Sua estrutura apresenta várias aminas espaçadas por moléculas de carbono. As aminas no intestino ligam-se a prótons e interagem com ânion Pi por meio de carga e ligação com hidrogênio. Estudos *in vitro* demonstraram que 1 g de Sevelamer liga-se a aproximadamente 5 mmol de Pi em pH 7 (CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002; COPPOLINO *et al.*, 2015). Sua característica química permite uma ligação inespecífica com moléculas carregadas com cargas negativas, como ânions trivalentes, como o Pi e citrato, ácidos biliares e aminoácidos conjugados carregados negativamente. Além do Pi, liga-se a outras substâncias no intestino onde diminui a absorção de lipídios, ácido úrico e possui efeito anti-inflamatório, sendo considerado um agente protetor do sistema cardiovascular. Também pode diminuir a concentração de endotoxinas bacterianas e AGEs (CHARMOT, 2012; HAUSER *et al.*, 2010).

Figura 3—Estrutura química do Sevelamer



Fonte: Rastogi, 2013.

Nota: a, b = número de aminas primárias,  $a+b=9$ . c = número de grupos de ligações cruzadas,  $n=1$ . m = número para indicar rede de polímero.

Existem duas formas de Sevelamer: cloridrato de Sevelamer e carbonato de Sevelamer; ambos diminuem a absorção intestinal de Pi em uma mesma proporção (COPPOLINO *et al.*, 2015; SAVICA *et al.*, 2009; VANHOLDER *et al.*, 2009). O primeiro pode diminuir os níveis séricos de bicarbonato e contribui para a acidose metabólica em pacientes com DRC, enquanto que o carbonato de Sevelamer por não alterar os níveis de bicarbonato não possui o efeito adverso do primeiro. Vale salientar que podem também levar a uma redução de vitaminas tais como a vitamina D, vitamina K e ácido fólico, além de alterar a absorção de alguns fármacos como, por exemplo, a levotiroxina e o calcitriol, representando potenciais efeitos adversos do Sevelamer (FLOEGE, 2016; PIERCE *et al.*, 2011).

Toxinas urêmicas, tais como os AGEs, podem se ligar ao Sevelamer na luz intestinal e não serem absorvidas. A administração desse fármaco e a restrição da ingestão de AGEs presentes nos alimentos podem representar um meio complementar e não tóxico para reduzir os níveis de *Reactive oxygen species* (ROS) e a inflamação (VLASSARA *et al.*, 2012a). De fato, em análise de pacientes em hemodiálise (HD) com diabetes tipo 2, verificou-se que a administração de Sevelamer durante três semanas, não só reduziu os níveis circulantes de AGEs em geral, mas também os níveis de carboximetilisina (CML) e metilglioxal (MG), e levou a mudanças nos níveis séricos de Pi, lipídios, marcadores inflamatórios, e ROS. Para tanto, verificou-se uma diminuição na expressão de *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), um marcador de lesão vascular (VLASSARA *et al.*, 2012a; YUBERO-SERRANO *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado em estudos envolvendo pacientes com nefropatia diabética que o Sevelamer diminuiu significativamente o FGF-23 e aumentou os níveis circulantes de Klotho, proteínas envolvidas na homeostase do Pi (LIN *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2010b; VLASSARA *et al.*, 2012b; ZOCCALI; MALLAMACI; CANNATA-ANDÍA, 2015). Maizel *et al.* (2013), demonstraram que o Sevelamer melhorou a taxa de expansão sistólica da aorta e a função diastólica. Os autores ainda constataram após 14 semanas de tratamento com Sevelamer houve uma redução nos níveis séricos de FGF-23 em camundongos com DRC (MAIZEL *et al.*, 2013). Finalmente, diferentes estudos têm sugerido que o Sevelamer pode estar associado com a diminuição da progressão de calcificações arterial em comparação com quelantes à base de cálcio (ASMUS *et al.*, 2005; BLOCK *et al.*, 2005a; CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002; KAKUTA *et al.*,

2011; SIX *et al.*, 2012), embora esse efeito não tenha sido confirmado por outros estudos (BARRETO *et al.*, 2008).

## 2.6 INTERLEUCINA 8 E QUIMIOTAXIA

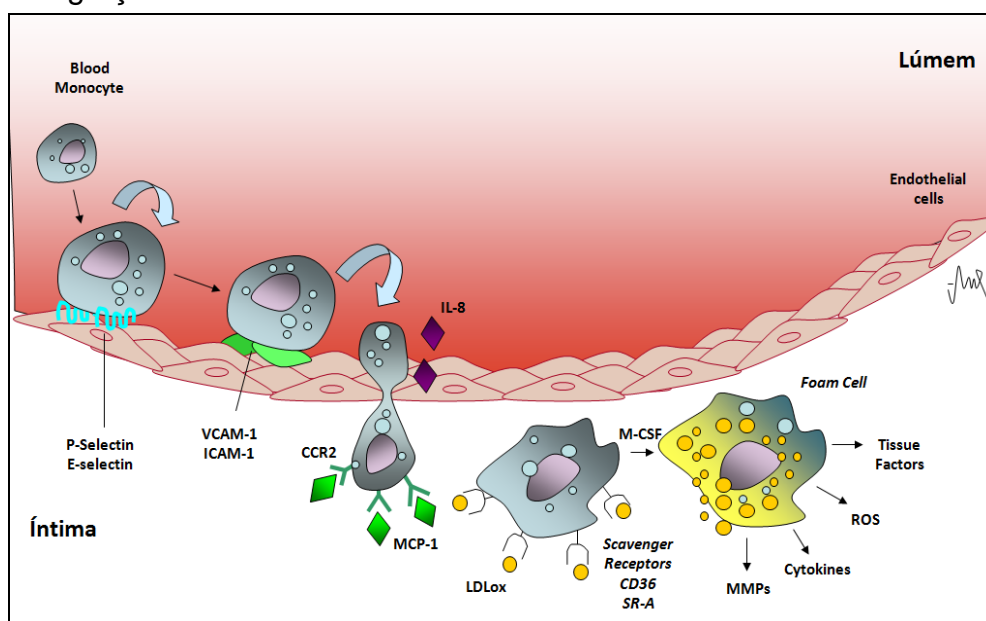
A IL-8 (IL-8/CXCL8) é uma citocina que desempenha um papel vital na maioria das vias inflamatórias. O gene da IL-8 codifica a produção de um produto de 99 aminoácidos, o qual sofre uma clivagem proteolítica na porção amino-terminal, formando vários produtos diferentes (PALOMINO; MARTI, 2015). A IL-8 em solução existe sob a forma de um dímero ligado de maneira não covalente e, *in vitro* e *in vivo*, ela é um quimiotático potente para neutrófilos (SANACORA *et al.*, 2015). A IL-8 é produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, células epiteliais, células de músculo liso e células endoteliais. Apresenta duas isoformas: uma formada por 72 resíduos de aminoácidos derivado de células endoteliais e a forma mais abundante no organismo com 77 resíduos de aminoácidos secretada pelos monócitos e outras células. Os seus efeitos biológicos são mediados por meio da ligação com receptores de superfície celular acoplados a proteína G, CXCR1 e CXCR2, onde o primeiro tem uma maior afinidade e expressão. Esses receptores normalmente são encontrados na superfície de leucócitos e células endoteliais (CAMPBELL; MAXWELL; WAUGH, 2013; LIU; DAI; ZHOU, 2015).

Durante o processo inflamatório, a IL-8 exerce a quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão, induzindo a adesão e a transmigração através do endotélio. Além disso, a IL-8 estimula outras células para realizar fagocitose, aumentando assim a eficiência de reparação de tecidos. Assim como vários outros quimiotáticos, a IL-8 induz à reorganização do citoesqueleto, alterações nos níveis de cálcio intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares e *burst* respiratório (GIMBRONE *et al.*, 1989; JUNDI; GREENE, 2015). Estudos demonstram uma correlação entre IL-8 e a angiogênese tumoral, metástase e mau prognóstico em diversos tipos de câncer (TANG *et al.*, 2012). Embora a IL-8 seja por excelência um agente quimiotático de granulócitos, também induz a adesão de monócitos ao endotélio nas fases iniciais da aterogênese (WEBER, 2004). De fato, a associação da IL-8 com a inflamação e no processo da aterogênese (ALLEN; KURDOWSKA,

2013) está amplamente descrito na literatura. Em contrapartida, um efeito protetor tem sido relatado em estudos *in vitro*, que avaliaram a adesão de neutrófilos e monócitos no local da lesão (GALES *et al.*, 2013; GIMBRONE *et al.*, 1989; TEDGUI *et al.*, 2006). Segundo Hastings *et al.* (2009), a expressão de VCAM-1 por células musculares lisas e por células endoteliais foi reduzida na presença de IL-8, ocasionando uma menor adesão de monócitos ao local da inflamação (HASTINGS *et al.*, 2009). Há relatos ainda, que a migração neutrofílica foi severamente prejudicada em camundongos, mostrando níveis elevados de IL-8 (SIMONET *et al.*, 1994).

A interação dos monócitos com o endotélio vascular durante a inflamação ocorre por meio de várias etapas envolvendo o rolamento mediado pela selectina, adesão leve mediada por moléculas de adesão como a VCAM-1 e a *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e subsequente adesão firme mediada por quimiocinas, como a IL-8 e o MCP-1. Monócitos aderentes ao endotélio migram através da camada íntima, transformam-se em macrófagos, e fagocitam lipídios oxidados, tornando-se células espumosas ou *foam cells* (Figura 4). Este dinâmico e controlado mecanismo contribui para o crescimento e expansão das lesões, e o recrutamento de monócitos participa diretamente na desestabilização da placa aterosclerótica, resultando em complicações associadas a taxas significativas de morbidade e mortalidade (LI; GLASS, 2002).

Figura 4—Migração de monócitos através do endotélio vascular



Fonte: Stinghen *et al.* (2009).

## 2.7 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA DIMINUIÇÃO DE AGEs

A interação entre AGEs e RAGEs tem sido considerada uma importante via inicial na sinalização intracelular, dentre elas a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como a *interleukin-1- $\alpha$*  (IL-1 $\alpha$ ), *interleukin-6* (IL-6), IL-8 e TNF $\alpha$  (BONETTI *et al.*, 2013; POLJICANIN *et al.*, 2015). Tendo em vista os muitos efeitos deletérios dos AGEs sobre a função celular, é essencial o desenvolvimento de estratégias terapêuticas relacionadas à essa toxina (GOLDBERG *et al.*, 2004).

Várias estratégias de tratamentos farmacológicos que atuem no sistema AGEs-RAGE tem sido descrito como uma forma de atenuar os danos causados ao organismo. Para tanto, alguns compostos têm sido amplamente estudados, incluindo o aspartato aminotransferase-120 (AST-120) e o Sevelamer. O AST-120 é um adsorvente de carvão oral que atenua a progressão da DRC, possivelmente, por meio da remoção de toxinas urêmicas, tal como o indoxil sulfato (IS) e pela diminuição do estresse oxidativo (FUJII *et al.*, 2009; SCHULMAN; VANHOLDER; NIWA, 2014). Estudos demonstraram em camundongos com DRC que o AST-120 reduziu a progressão da aterosclerose. Ainda, foi capaz de inibir a adesão de monócitos em células endoteliais com a progressão da DRC e diminuir a concentração de IS (INAMI *et al.*, 2014). Além disso, o AST-120 é capaz de reduzir os níveis de MCP-1, IL-1 e TNF $\alpha$  em modelo animal com DRC (YAMAMOTO *et al.*, 2011). O Sevelamer, por sua vez, reduz níveis de AGEs e RAGE na circulação de pacientes diabéticos com DRC (YUBERO-SERRANO *et al.*, 2015). A administração desses fármacos diminui os níveis circulantes de toxinas como o IS, *p*-cresol e AGEs, podendo proporcionar uma potencial melhoria na qualidade de vida e na sobrevida dos pacientes com DRC (INAMI *et al.*, 2014; UEDA *et al.*, 2007; VLASSARA *et al.*, 2012a).

Em outra linha de investigação, a restrição dietética de AGEs tem emergido como um método eficaz, viável e econômico para reduzir os níveis circulantes de AGEs (SANDU *et al.*, 2005; URIBARRI, 2003). A simples modificação nos métodos de preparo dos alimentos industrializados pode contribuir efetivamente com a redução da formação de AGEs e, consequentemente, a menor ingestão dessa toxina (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).



Atualmente, existem várias técnicas substitutivas a função renal, amplamente utilizadas que contribuem também para a diminuição dos níveis circulantes de AGEs, como a hemodiálise (HD), hemofiltração (HF) e hemodiafiltração. Uma sessão convencional de HD reduz em até 20% os níveis de AGEs no organismo. Por outro lado, membranas com elevada permeabilidade podem reduzir ainda mais a concentração dessa toxina. Estudos demonstraram que a hemodiafiltração por 6 meses em pacientes com DRC leva a uma redução significativa nos níveis de AGEs circulantes (LIN *et al.*, 2003). A hemodiafiltração é eficaz não apenas em reduzir os níveis de toxinas urêmicas, mas também em reduzir os níveis de marcadores de inflamação, tais como a IL-6 (AGALOU *et al.*, 2003; SUSANTITAPHONG; SIRIBAMRUNGWONG; JABER, 2013).

Outro aspecto que tem atraído o interesse de pesquisadores é a presença de compostos que apresentam propriedades de anti-glicação e/ou antioxidantes nos alimentos. Diversos compostos têm sido empregados para atenuar a glicoxidação e o estresse oxidativo, tais como vitamina A, vitamina E, e o ácido lipóico, sendo amplamente estudados *in vitro* para reduzir os efeitos dos AGEs (BARAGETTI *et al.*, 2006). Entretanto, mais estudos são necessários para a elucidação de mecanismos que atuem de forma efetiva na remoção e formação dos AGEs e dessa forma atenuar os danos causados por essa toxina ao organismo.

### 3 JUSTIFICATIVA

A progressão da DRC leva ao acúmulo de toxinas urêmicas tais como os AGEs, causando a ativação da resposta inflamatória sistêmica e vascular, mediadas por moléculas pró-inflamatórias. O acúmulo de AGEs, provindos da dieta ou de um *clearance* diminuído, no decorrer da DRC pode contribuir para a disfunção endotelial levando a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão nos eventos que precedem a aterosclerose, uma das principais causas de morte nesses pacientes. Até o momento as estratégias terapêuticas disponíveis são ineficientes na remoção dos AGEs. Nesse panorama, fármacos capazes de reduzir os níveis circulantes de AGEs, tais como o Sevelamer, poderiam hipoteticamente contribuir para a diminuição da resposta celular e, conseqüentemente, desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito *in vitro* do Sevelamer na disfunção endotelial causada por AGEs em células endoteliais humanas.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir e caracterizar os AGEs;
2. Avaliar a expressão do receptor para AGEs (RAGE) em células endoteliais, após a exposição aos AGEs na presença ou ausência de Sevelamer;
3. Avaliar a expressão da citocina inflamatória IL-8, em células endoteliais após exposição aos AGEs na presença ou ausência de Sevelamer;
4. Avaliar a participação da IL-8 produzida por células endoteliais tratadas com AGEs com e sem Sevelamer, como agente quimiotático de monócitos.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 MATERIAL

Como modelo experimental utilizou-se a linhagem comercial imortalizada de células endoteliais extraídas de veia de cordão umbilical (ATCC CRL 2922, EA.hy926). Essa linhagem é proveniente da fusão de *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) com células epiteliais tumorais A549 formando um hibridoma (EDGEALL; MCDONALD; GRAHAM, 1983). As células foram obtidas comercialmente a partir do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Os monócitos da linhagem celular U-937 (CRL-1593.2, ATCC), foram adquiridas comercialmente também do BCRJ e são derivadas de células malignas obtidas de efusão pleural de um paciente com linfoma histiocítico.

### 5.2 MÉTODOS

#### 5.2.1 Cultura Celular

As células endoteliais foram cultivadas em frascos de cultivo à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 100% de confluência. O meio de cultura utilizado foi DMEM (Life Technologies, Nova Iorque, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA) e 10mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA). As células usadas como modelo de monócitos foram a U-937. Optou-se por utilizar como modelo experimental essas células ao invés de monócitos isolados de sangue periférico humano, uma vez que esse processo resulta em ativação das mesmas, podendo influenciar negativamente nos resultados. Os monócitos foram cultivadas em meio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 10mg/mL de penicilina/estreptomicina. Os monócitos foram mantidos em frasco de cultivo T25 (25cm<sup>2</sup>) ou T75 (75cm<sup>2</sup>) e incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.2 Síntese e Caracterização dos AGEs

Os AGEs e controle (BSA) foram preparados como previamente descrito (IWASHIMA *et al.*, 1999). Basicamente a produção dos AGEs foi realizada a partir da adição de D-glucose, BSA e demais substâncias em PBS pH 7.4 esterilizado nas seguintes proporções:

- Albumina bovina (BSA): 50mg/mL (Sigma, St. Louis, EUA).
- D-glucose: 50mM (Gibco, Grand Island, EUA).
- PMSF: 1,5mM.
- EDTA: 0,5mM (Merck, Darmstadt, Alemanha).
- Penicilina/Estreptomicina: 10mg/mL (Gibco, Grand Island, EUA).

Para a produção do BSA, realizou-se a adição de BSA e demais substâncias em PBS pH 7.4 esterilizado nas seguintes proporções:

- BSA: 50mg/mL (Sigma, St. Louis, EUA).
- PMSF: 1,5mM.
- EDTA: 0,5mM Penicilina/Estreptomicina: 10mg/mL (Gibco, Grand Island, EUA).

As soluções foram preparadas separadamente e agitadas cuidadosamente até que uma solução homogênea fosse formada. Após o preparo e o pH corrigido para 7.4, ambas as soluções foram transferidas para tubos envoltos em papel alumínio e armazenadas por sete semanas em estufa 37°C/5% CO<sub>2</sub>. O pH foi monitorado e ajustado semanalmente para 7.4. Decorridas as sete semanas de incubação, os AGEs e BSA foram submetidos separadamente à diálise em membrana (6-8Kd, Spectra, São Paulo, Brasil) contra PBS pH 7.4 num volume cinquenta vezes maior que a amostra a ser dialisada, por um período de aproximadamente 16 horas, sob agitação constante a 4°C. Após o processo de diálise, as soluções de AGEs e BSA foram aliquotadas e estocadas a - 20°C até o uso. Realizou-se a caracterização pela leitura comparativa de absorbâncias dos AGEs e BSA, tomando-se por base o protocolo estabelecido primeiramente por PONGOR *et al.*, 1984. Ambas as amostras foram diluídas em água destilada para 1mg/mL para posterior leitura de absorbâncias nos comprimentos de onda 330, 360,

400 e 420nm em espectrofotômetro (Tecan, Zurique, Suíça). Os AGEs e BSA também foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) como previamente descrito (LAEMMLI, 1970). Basicamente, 15 µg das amostras foram submetidas à eletroforese em gel a 10% a 100 V por 4 h a temperatura ambiente com pólos invertidos. As bandas foram visualizadas com o corante azul Coomassie (Sigma St. Louis, EUA).

### 5.2.3 Quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de AGEs e BSA previamente sintetizadas, foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de (BRADFORD, 1976), com auxílio do *kit Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

### 5.2.4 Dosagem de endotoxinas

Para excluir a contaminação com endotoxinas de AGEs e BSA, foi realizado o ensaio colorimétrico de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (*Thermo Scientific Rockford*, IL, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As absorbâncias foram medidas a 410 nm (Tecan, Zurique, Suíça) e todas as medições foram feitas em duplicata.

### 5.2.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), segundo o método previamente descrito por (MOSMANN, 1983). Basicamente as células endoteliais foram cultivadas em placas de 96 poços ( $10^4$ /poço) e após um período de 24h de incubação, o meio foi trocado e as células foram tratadas com os AGEs e BSA, em concentrações de 0,2 mg/mL, por período adicional de 24 horas. Posteriormente, o

meio foi substituído por meio novo (90  $\mu$ L/poço) e 10  $\mu$ L/poço da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) (Sigma, St. Louis, EUA), por um período de 3 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente o meio foi retirado e substituído por dimetilsulfóxido (Sigma, St. Louis, EUA) para a dissolução dos cristais de formazan, sob agitação (700 rpm, 15 min), e a leitura da absorbância foi realizada num comprimento de onda de 570nm em leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Califórnia, EUA). As dosagens foram realizadas em microplaca. Foram realizados três experimentos em triplicata.

#### 5.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de  $1D^{31}P$  foram obtidos em espectrômetro de RMN (Bruker *Avance III*, Califórnia, EUA) operando a 14,1 Tesla (600 MHz para  $^1H$  e 242 MHz  $^{31}P$ ), equipado com uma sonda pentanuclear de observação inversa de 5 mm e gradiente de campo no eixo z (QXI). Avaliou-se a concentração de Pi em amostras contendo AGEs e BSA ambos em uma concentração de 0,2 mg/mL e Pi (1 e 4 mM), com ou sem Sevelamer (3%), com a finalidade de validar *in vitro* o efeito quelante do Sevelamer sobre o Pi em sobrenadante celular. As amostras foram solubilizadas em 600 $\mu$ L de uma solução de D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) à temperatura de 30°C. Os espectros de  $^{31}P$  desacoplados foram obtidos com 30° de ângulo magnetização com janela de 400 ppm, tempo de aquisição de 0,17 s, tempo de relaxação de 0,200 s e 1024 transientes, processados com o auxílio do programa TopSpin (Bruker; Karlsruhe, Alemanha), aplicando-se multiplicações exponenciais sobre os *free induction decays* (FIDs) adquiridos. Foram realizados três experimentos independentes.

#### 5.2.7 Avaliação da expressão de RAGE por imunocitoquímica

A expressão do RAGE foi avaliada por meio da técnica de imunocitoquímica. Basicamente as células foram inoculadas em lamínulas redondas em placas de 24 poços (25 x 10<sup>3</sup> células/lamínula) e após atingirem cerca de 70% de confluência foram tratadas com AGEs e BSA em concentrações de 0,2 mg/mL por um período de 24 horas. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%

por 10 minutos e em seguida, adicionou-se o bloqueio de BSA 0.5% em PBS. As células foram incubadas com os anticorpos primários anti-RAGE 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), *overnight* a 4 °C. Em seguida as células foram tratadas com anticorpo secundário anti-*rabbit* 1:2000 marcado com peroxidase (HRP). A reação foi revelada com o kit VectorNovaRED (Califórnia, EUA). As lamínulas foram observadas em aumento de 200 vezes em microscópio de luz motorizado Axiolmager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), acoplado a um digitalizador automático VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE). Foram realizados cinco experimentos em duplicata.

#### 5.2.8 Avaliação da expressão de RAGE por *Western blot*

A avaliação da expressão de RAGE por *Western blot* foi realizada após tratamento das células com 0,2 mg/mL de BSA e AGEs durante 24 horas. Basicamente, as células foram homogeneizadas com tampão RIPA (NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% dodecilsulfato de sódio (SDS), 50 mM de Tris, pH 7,4) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000g durante 30 min. a 4 °C e os sobrenadantes recolhidos. A concentração de proteínas foi estimada utilizando-se o ensaio de Bradford (BioRad, Hercules, Califórnia, EUA). Quantidades iguais de proteína (20 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio a 12%, transferidas eletroforéticamente para membranas de PVDF (Invitrogen Corp, Carlsbad, Califórnia, EUA). A membrana foi bloqueada durante 1h a temperatura ambiente com solução de PBS contendo 0,3% (v/v) de tween e 3% de caseína. Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com anticorpo monoclonal anti-RAGE na concentração de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), seguido por incubação com anti-IgG de coelho policlonal conjugado com peroxidase (HRP) (1:10.000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 1h a 37 °C. A reação foi visualizada por quimioluminescência (ECL) (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). A expressão de RAGE foi detectada como uma banda única a cerca de 42 kDa. A intensidade das bandas foi analisada com auxílio



do Software Image Studio Lite (Lincoln, EUA), versão 5.0. Foram utilizados três experimentos.

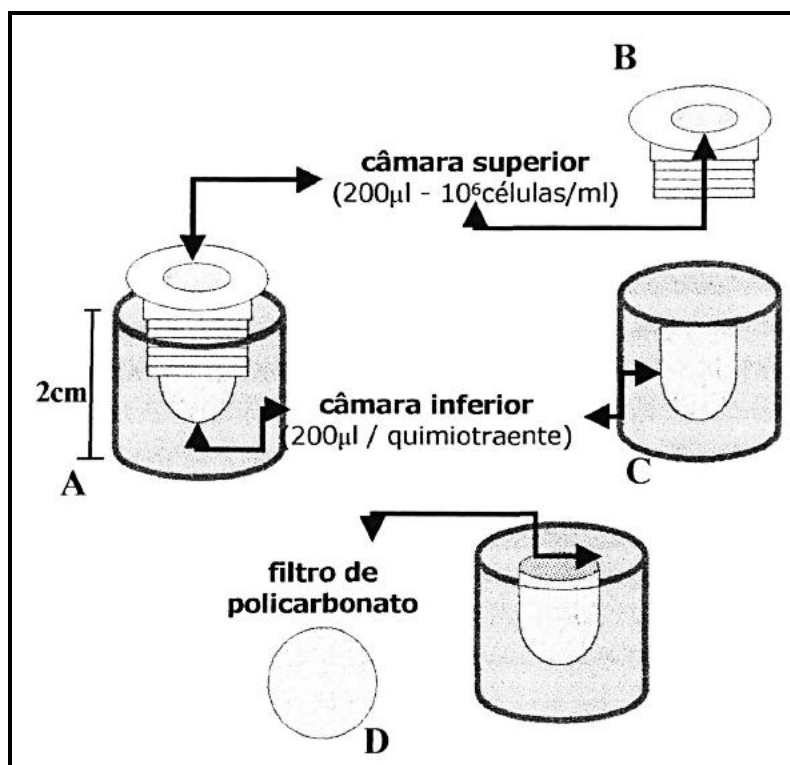
#### 5.2.9 Avaliação da expressão de IL-8 por ELISA

As dosagens de IL-8 foram realizadas em sobrenadante de cultura celular por meio do método de ELISA *sandwich* “caseiro”. Basicamente as células foram inoculadas ( $10^4$  células/poço) em placas de 96 poços e tratadas com AGEs e BSA em concentrações de 0,2 mg/mL com e sem Sevelamer em cinética de 0, 3 e 6h. Posteriormente os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20 °C para posterior dosagem. Os anticorpos utilizados foram da marca R&D Systems (Minneapolis, EUA) (captura, detecção e recombinante), nas concentrações sugeridas pelo fabricante (STINGHEN *et al.*, 2009). Para a leitura das absorbâncias foi utilizado leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Califórnia, EUA) em absorbância de 450 nm. Foram realizadas dez experimentos em duplicata.

#### 5.2.10 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado em câmara de Boyden com filtro de polycarbonato isento de polivinilpirrolidona com porosidade de 8,0µm, o qual foi utilizado para separar os compartimentos superior e inferior (Figura 5) (GE Healthcare Life Sciences do Brasil Ltda.) (LEAVESLEY *et al.*, 1993; LI; ZHU, 1999).

Figura 5—Câmara de Boyden

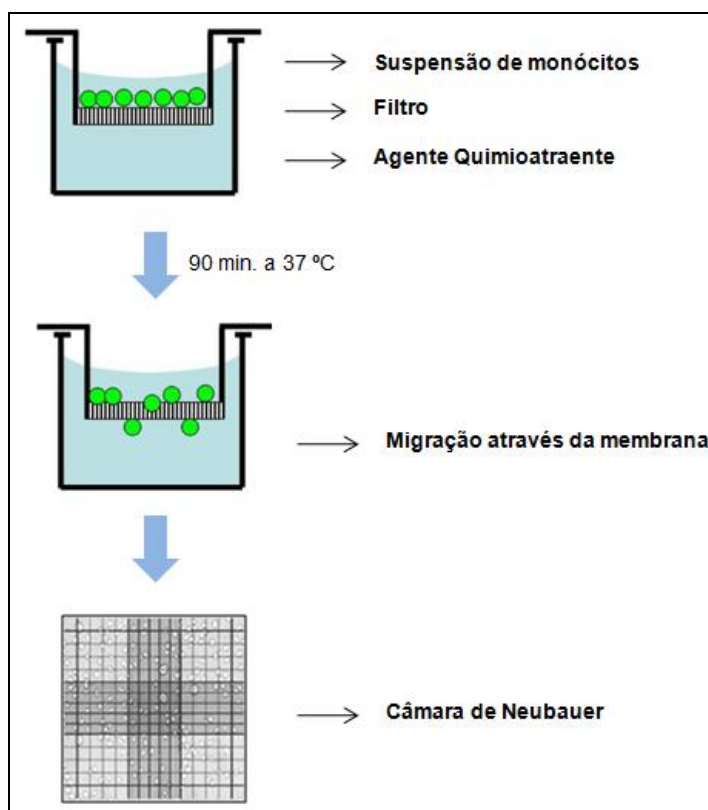


Fonte: Presibella, 2003.

Nota: Desenho esquemático da câmara de Boyden. (A) Cilindro de acrílico separado por um compartimento superior (B), o qual se adiciona a suspensão de células, e um compartimento inferior (C), sendo preenchido pela substância quimioatraente e divididos por um filtro de polycarbonato (D).

Basicamente as células foram inoculadas ( $10^4$  células/poço) em placas de 96 poços e tratadas com AGEs e BSA em concentrações de 0,2 mg/mL com e sem Sevelamer por 6h. Posteriormente o sobrenadante celular foi adicionado no compartimento inferior da câmara de Boyden para avaliar o efeito quimioatraente sob monócitos. Utilizou-se como controle positivo uma solução padrão de MCP-1, IL-8 e IL-8 mais MCP-1 a 50 ng/mL. O monitoramento do movimento espontâneo dos monócitos (controle negativo) foi realizado com adição de meio DMEM no compartimento inferior da câmara. Posteriormente, o compartimento superior da câmara foi preenchido com 200µL de suspensão de monócitos a  $10^6$  células/mL sobre o filtro. Em seguida, as câmaras foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos. A capacidade quimioatraente do sobrenadante (migração) foi mensurada por meio da contagem do número de células que estavam no compartimento inferior com auxílio da câmara de Neubauer (Figura 6) (PERRETTI *et al.*, 2002). Foram realizados seis experimentos em duplicata.

Figura 6—Ilustração esquemática do processo de migração através da câmara de Boyden



Fonte: O autor (2015).

#### 5.2.11 Análise estatística

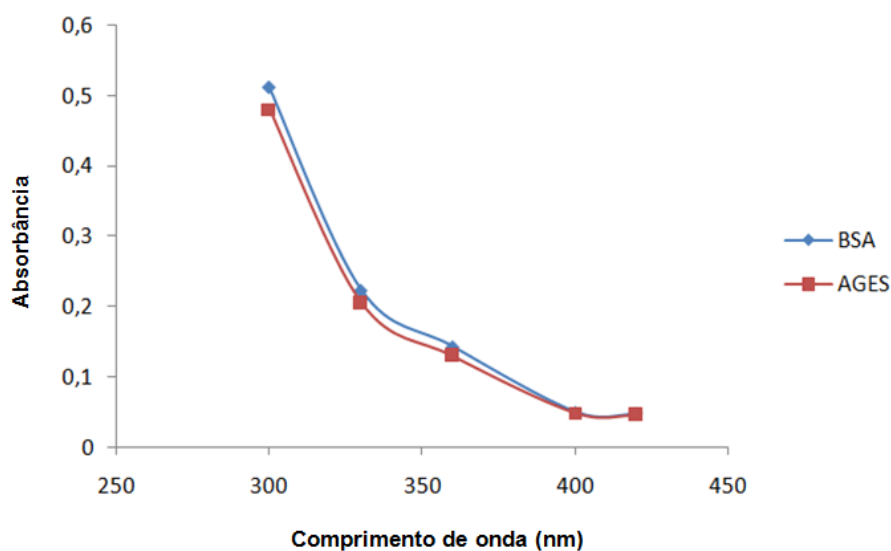
Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  erro padrão da média. Para comparar o resultado entre os grupos foram realizados os testes  $t$  de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova onRank's para dados não pareados. Os resultados foram considerados significativos para um valor de  $P \leq 0,05$ . As análises foram realizadas com o uso dos pacotes estatísticos JMP Windows (Carolina do Norte, EUA) versão 8.0 e SigmaStat Windows version 3.5 (Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS AGEs

Para a caracterização de BSA e AGEs, as amostras foram submetidas a leitura de absorbâncias de acordo com a figura 7.

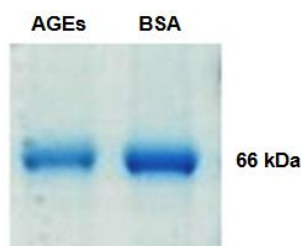
Figura 7–Absorbâncias encontradas nas soluções de AGEs e BSA



Fonte: O autor (2015).

Os AGEs e BSA também foram caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), como previamente descrito (LAEMMLI, 1970), com a finalidade de avaliar qualitativamente a diferença entre as duas moléculas (Figura 8).

Figura 8– Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)



Fonte: O autor (2015).

## 6.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Foi realizada a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford das amostras de BSA e AGEs com o intuito de quantificar a concentração de proteínas nessas amostras (Tabela 2) (BRADFORD, 1976).

Tabela 2–Quantificação de proteínas totais nas amostras de BSA e AGEs

Amostras	[ ] de proteínas em mg/mL
BSA	59.90
AGEs	59.65

Fonte: O autor (2015).

## 6.3 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS

A fim de excluir a contaminação por endotoxinas dos AGEs sintetizados, a concentração destas foi mensurada pelo método de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (Rockford, IL, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante (Tabela 3). Os resultados obtidos foram adequados ao recomendado para uso em água de diálise sendo inferiores a 2,0 EU/mL (Valor recomendado pela Anvisa–RDC 154/2004).

Tabela 3–Absorbâncias das amostras de BSA e AGEs

Amostras	[ ] de endotoxinas
BSA	1,65 EU/mL
AGEs	1,04 EU/mL

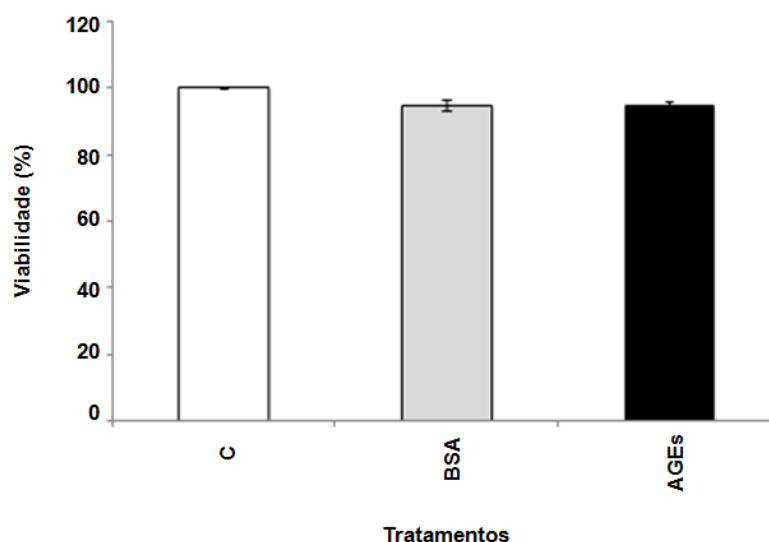
Fonte: O autor (2015).

Nota: Foi considerada a concentração de endotoxinas em água de diálise como valor de referência (2 EU/mL).

#### 6.4 VIABILIDADE CELULAR

A análise da viabilidade celular por meio do MTT não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos com meio de cultivo (controle normal), BSA e AGEs para todos os tratamentos aplicados (Figura 9).

Figura 9– Avaliação da viabilidade celular após exposição ao BSA e AGEs



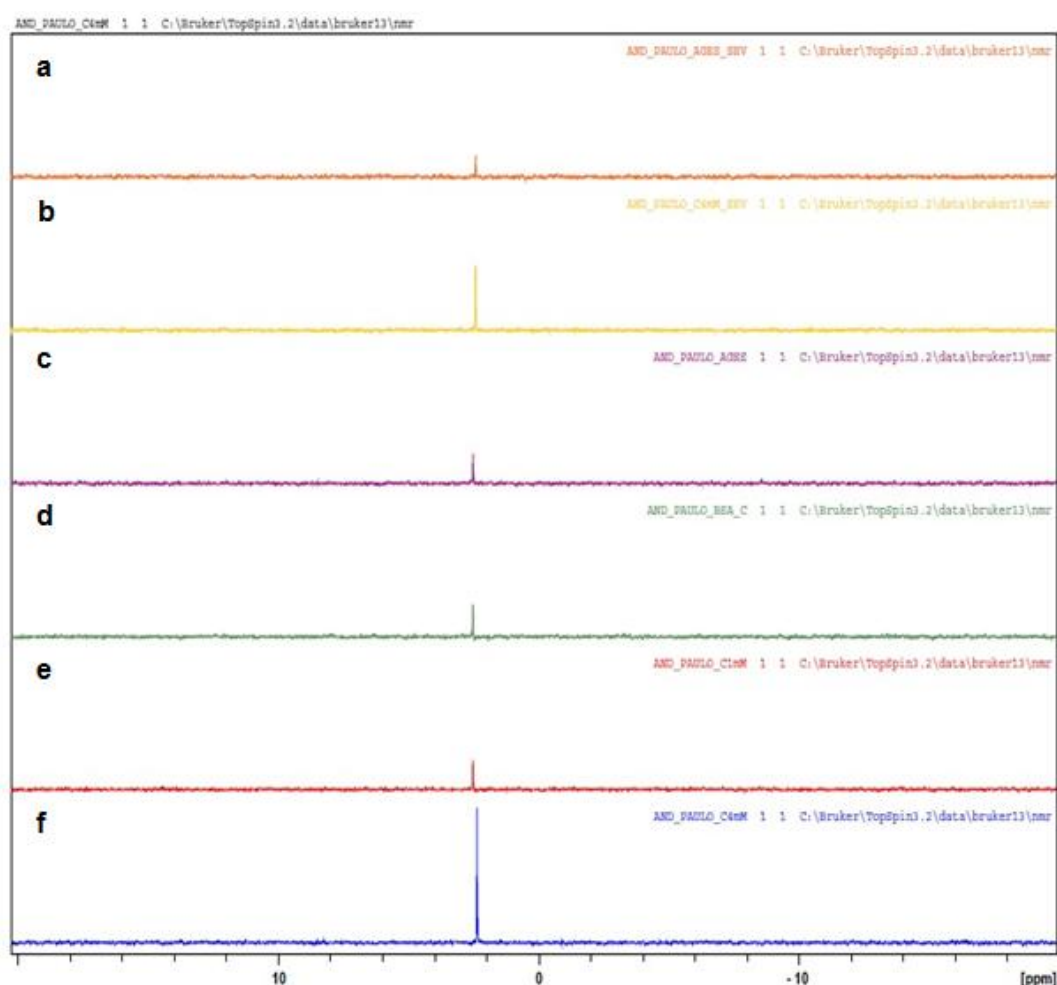
Fonte: O autor (2015).

Nota: As células endoteliais foram tratadas com BSA e AGEs (0,2mg/mL) a 37°C por 24 h e incubadas com MTT durante 3 horas. O controle (células não tratadas) foi considerado como 100%. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

## 6.5 RMN

Com o intuito de verificar se o Sevelamer liga-se *in vitro* ao Pi, uma vez que esta droga foi desenvolvida para quelar este íon, foi realizado a RMN. Avaliou-se a concentração de Pi (1mM e 4mM) em sobrenadante celular contendo AGEs, BSA e Pi, com ou sem Sevelamer (3%). Observou-se uma redução na concentração de Pi nas amostras com Sevelamer, confirmando a ação desse quelante em se ligar ao Pi *in vitro*. Com isso foi possível validar o efeito do Sevelamer como quelante de Pi (Figura 10).

Figura 10—Efeito do Sevelamer nas amostras com Pi, nas concentrações de 1 e 4 mM com e sem Sevelamer



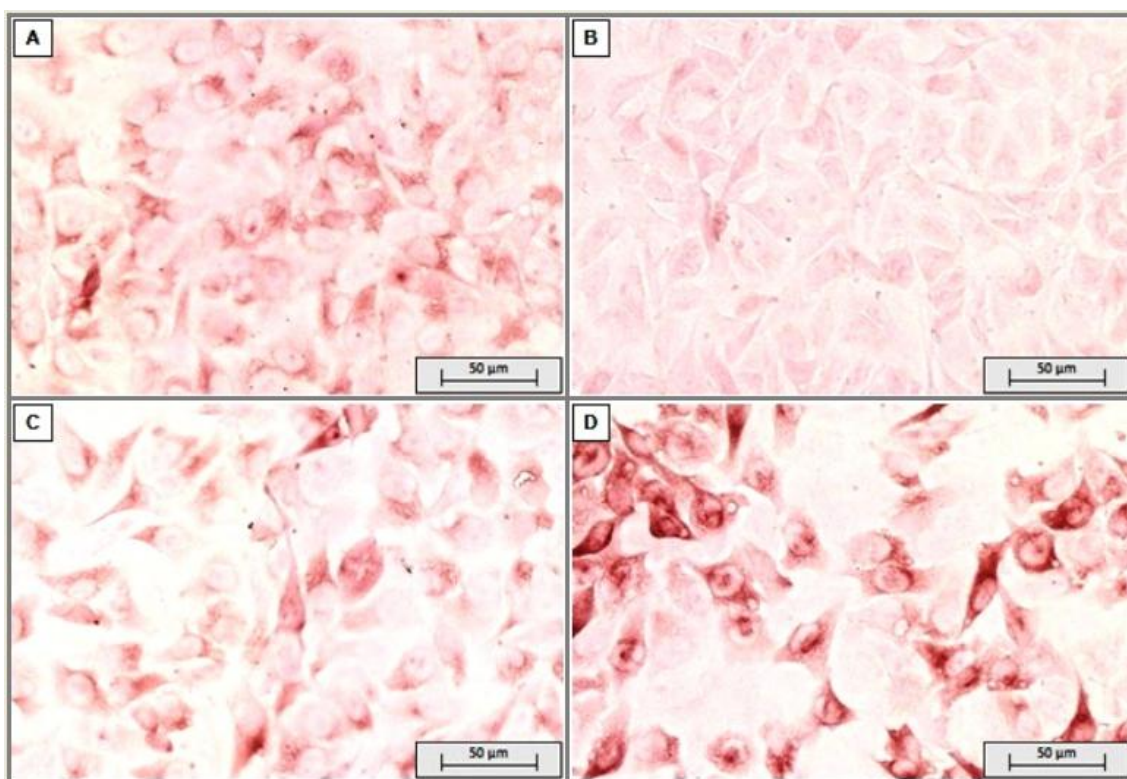
Fonte: O autor (2015).

Nota: Efeito do Sevelamer (Sev.) nas amostras com Pi, nas concentrações de 1 e 4 mM com e sem Sevelamer. (a) solução com 0,2 mg/mL de AGEs + Sevelamer (3%) + 1mM de Pi; (b) solução com 4 mM de Pi + Sev. (3%); (c) solução com AGEs 0,2 mg/mL + 1mM de Pi; (d) solução com 0,2 mg/mL de BSA + 1mM de Pi; (e) solução com 1 mM de Pi e (f) solução com 4 mM de Pi. Foram realizados três experimentos independentes.

## 6.6 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE RAGE

A expressão do RAGE foi avaliada por meio da técnica de imunocitoquímica, após tratamento das células endoteliais com BSA ou AGEs. A coloração positiva pode ser observada na (Figura 11), onde pode-se verificar uma maior expressão de RAGE após o tratamento com AGEs.

Figura 11–Efeito do BSA e AGEs na coloração por imunocitoquímica para RAGE



Fonte: O autor (2015).

Nota: As células endoteliais foram tratadas com BSA e AGEs (0,2 mg/mL) com ou sem tratamento (controle) durante 24h e imunocoradas para RAGE. (A) controle (células não tratadas); (B) somente anticorpo secundário; (C) BSA e (D) AGEs. Aumento de 200x. Foram realizados cinco experimentos em duplicatas.

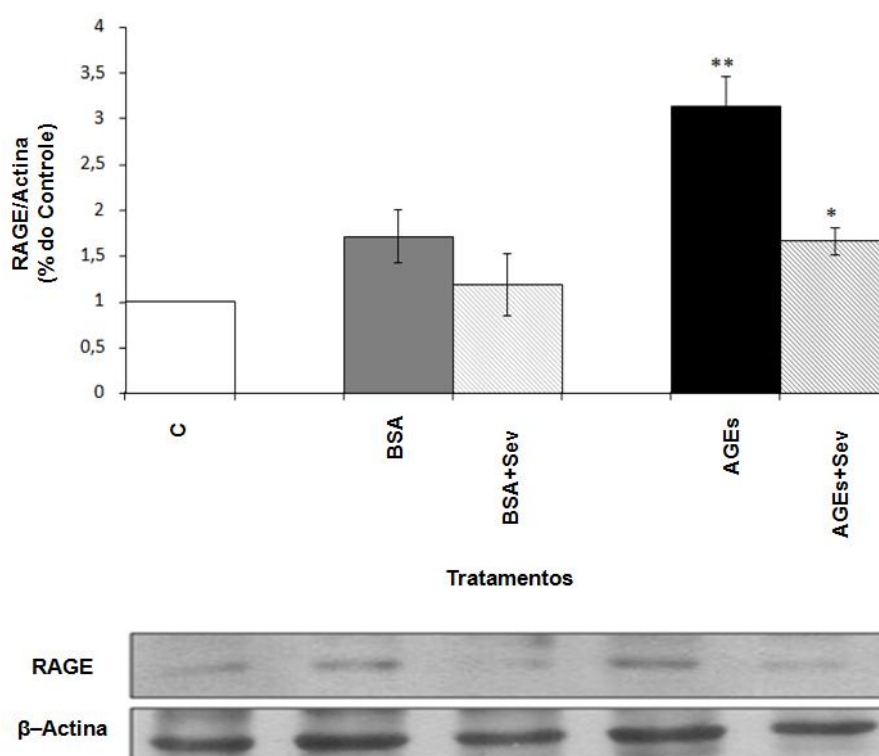
## 6.7 ANÁLISE POR *WESTERN BLOT* PARA DETECÇÃO DE RAGE

Com o objetivo de confirmar e quantificar a expressão de RAGE realizou-se análise da expressão de RAGE em células endoteliais por *Western blot*. As células



foram submetidas aos tratamentos com BSA e AGEs nas concentrações de 0,2 mg/mL com e sem Sevelamer (Figura 12).

Figura 12–Efeito dos AGEs sobre a expressão de RAGE em células endoteliais



Fonte: O autor (2015).

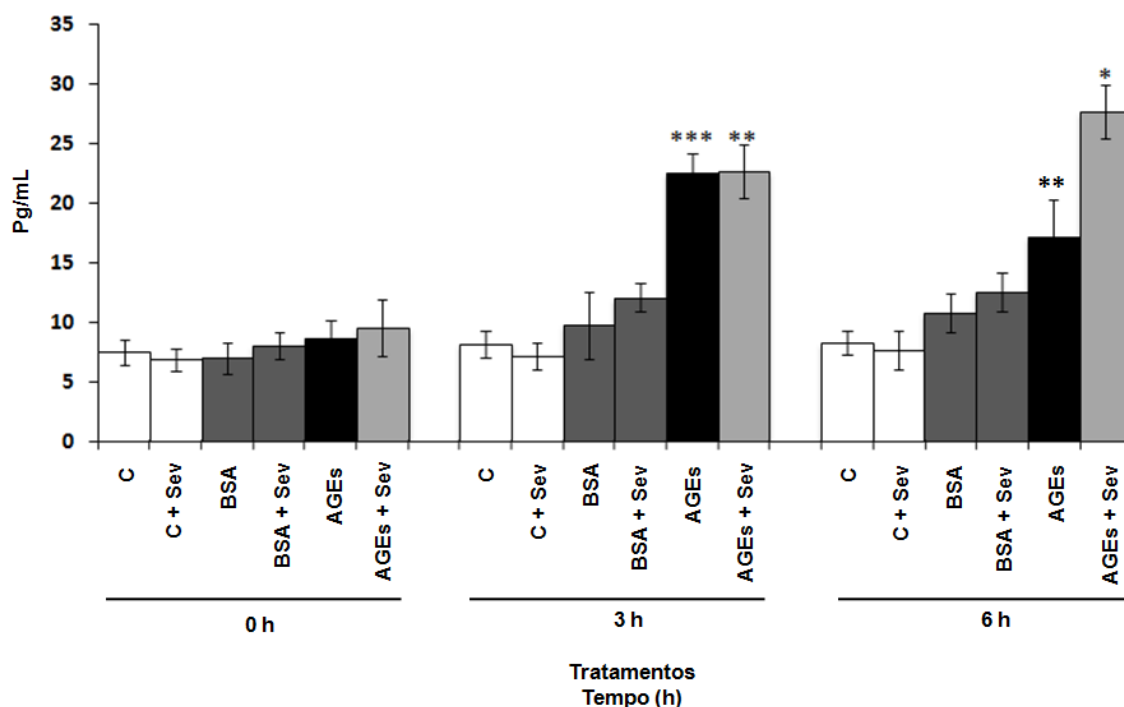
Nota: Expressão de RAGE em células endoteliais humanas após tratamento com BSA, AGEs com ou sem Sevelamer. As células endoteliais foram tratadas com BSA e AGEs (0,2 mg/mL), com e sem Sevelamer (Sev.) (3%) durante 24h. Para imunotransferência a  $\beta$ -actina foi utilizada como controle da carga das proteínas. Os níveis de RAGE foram quantificados por densitometria com a razão entre a  $\beta$ -actina. Os dados são expressos em média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. \* $P < 0,05$  – AGEs vs AGEs + Sev. e \*\*  $P < 0.005$  – AGEs vs C.

## 6.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-8 POR ELISA

A figura 13 demonstra o efeito do BSA e AGEs com e sem Sevelamer na expressão *in vitro* de IL-8 (pg/mL) pelas células endoteliais. Após 3h de tratamento, há uma expressão significativa ( $P < 0,001$ ) de IL-8 quando as células são tratadas com AGEs ( $21,06 \pm 0,8$  vs  $8,1 \pm 1,1$  pg/mL) em relação ao controle negativo

(somente meio de cultura). No tratamento com AGEs mais Sevelamer também foi encontrado um aumento significativo ( $P<0,005$ ) comparado ao controle negativo ( $22,66 \pm 2,2$  vs  $8,1 \pm 1,1$  pg/mL). Após 6h houve um aumento significativo ( $P<0,005$ ) na expressão de IL-8 quando as células são tratadas com AGEs em relação ao controle negativo ( $17,14 \pm 3,1$  vs  $8,2 \pm 1,0$  pg/mL), esta foi significativamente ( $P<0,05$ ) aumentada, quando foram tratadas com AGEs mais Sevelamer ( $17,14 \pm 3,1$  vs  $27,6 \pm 2,2$  pg/mL).

Figura 13–Efeito dos AGEs na expressão de IL-8 em células endoteliais



Fonte: O autor (2015).

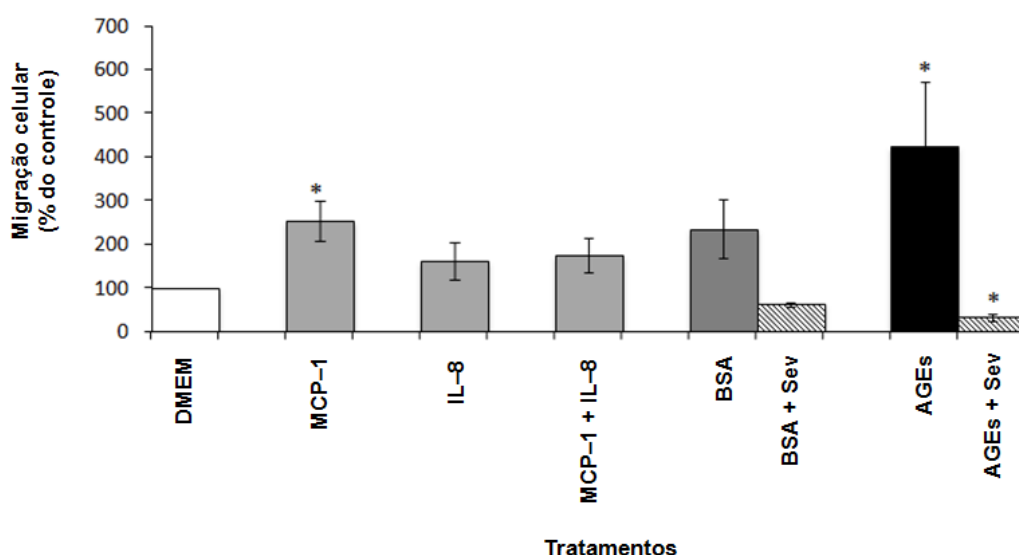
Nota: Tempo de incubação (0, 3 e 6h) após tratamento com AGEs (0,2mg/mL) com e sem Sevelamer (Sev) (3%) para a expressão de IL-8 em células endoteliais. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de dez experimentos independentes. \* $P<0,05$  – AGEs 6 vs AGEs 6 + Sev; \*\* $P<0,005$  – C3 vs AGEs + Sev 3, C6 vs AGEs 6; \*\*\* $P<0,001$  – C3 vs AGEs 3.

## 6.9 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O resultado apresentado na figura 14 demonstra o efeito do BSA e AGEs na presença ou ausência do Sevelamer na migração de monócitos. Utilizou-se como

controle negativo o meio DMEM, para avaliar o movimento espontâneo das células e como controle positivo o MCP-1, IL-8 e MCP-1 com IL-8 em uma concentração de 50 ng/mL para todas as soluções. Após 90 min. de incubação, houve um aumento significativo ( $P<0,05$ ) na migração de células nas amostras contendo MCP-1 ( $254,2 \pm 46,8\%$ ) e AGEs ( $402,3 \pm 163,8\%$ ) em relação ao controle negativo (somente meio DMEM tomado como 100%). Em contrapartida, na amostra contendo AGEs com Sevelamer houve um decréscimo significativo ( $P<0,05$ ) na migração em relação ao tratamento somente com AGEs ( $402,3 \pm 163,8$  vs  $33,3 \pm 7,4 \%$ ).

Figura 14—Efeito de sobrenadantes de células endoteliais na migração de monócitos



Fonte: O autor (2015).

Nota: Efeito de sobrenadantes de células endoteliais na migração de monócitos, após o tratamento com AGEs e BSA a 0,2 mg/mL, com e sem Sevelamer (Sev) a 3% em uma cinética de 6h. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de seis experimentos independentes \* $P<0,05$  – MCP-1 vs Control, AGEs vs Control, AGEs vs AGEs + Sev.

## 7 DISCUSSÃO

A inflamação em pacientes com DRC desempenha um papel crucial no desenvolvimento de complicações sistêmicas levando a várias comorbidades tal como a DCV. Os AGEs consistem num grupo heterogêneo de toxinas urêmicas responsáveis pela ativação de respostas celulares, causando efeitos deletérios tanto em nível micro quanto macrovascular (VLASSARA *et al.*, 2012a). O Sevelamer é um quelante de Pi com vários efeitos pleiotrópicos já descritos, amplamente utilizado nos pacientes com DRC para tratamento da hiperfosfatemia que pode levar também à diminuição dos níveis circulantes de toxinas urêmicas (OLIVEIRA *et al.*, 2010a; YUBERO-SERRANO *et al.*, 2015). Os principais achados do presente trabalho demonstram aumento significativo na expressão de RAGE após tratamento das células endoteliais humanas com AGEs corroborando com estudos previamente descritos na literatura (CHAWLA *et al.*, 2014). Além disso, demonstrou-se por meio do ensaio de *Western Blot* que houve aumento na expressão de RAGE na presença de AGEs, e após o tratamento com AGEs e Sevelamer, esse receptor teve sua expressão reduzida. Observou-se, ainda, níveis aumentados de IL-8 em células tratadas com AGEs na presença ou ausência de Sevelamer, sugerindo uma possível ligação do Sevelamer na ativação de vias inflamatórias nessas células. Demonstrou-se o efeito dos AGEs na indução da quimiotaxia de monócitos, uma vez que estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células endoteliais e dessa forma atua recrutando os monócitos para o local da lesão (MARCOVECCHIO; LUCANTONI; CHIARELLI, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A presença do Sevelamer para todos os tratamentos mostrou-se eficiente em inibir a quimiotaxia de monócitos.

Tem sido sugerido que os AGEs estão implicados no desenvolvimento da síndrome urêmica, desempenhando, por exemplo, um papel crucial na fisiopatologia da disfunção endotelial. Pacientes com DRC tem alta propensão ao acúmulo dos AGEs em virtude de uma filtração glomerular diminuída, além do aumento na sua formação. Estudos anteriores demonstraram em células endoteliais tratadas com soro urêmico em tempo e estágio dependente da DRC um aumento de biomarcadores inflamatórios, os quais estão envolvidos na quimiotaxia de células de defesa nos eventos que antecedem a aterosclerose (REMPEL *et al.*, 2015;

STINGHEN *et al.*, 2009). A exposição do endotélio a toxinas urêmicas conduz a uma série de alterações na homeostase vascular e em suas funções (GÜNTNER *et al.*, 2009). Os AGEs prejudicam a produção de NO, em parte, pela regulação negativa da NO sintase através do aumento da degradação do mRNA. Também inibem NO pelo aumento da expressão NADPH oxidase, estabelecendo uma ligação entre RAGE e disfunção endotelial crônica (JOURDE-CHICHE *et al.*, 2011; ROJAS *et al.*, 2000). O acúmulo de AGEs nos tecidos está associado com disfunção endotelial em pacientes urêmicos em hemodiálise, contribuindo na fisiopatologia da aterosclerose (JAIPERSAD *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016).

Nazratun *et al.* (2006) demonstraram um maior acúmulo de AGEs na parede de vasos sanguíneos, obtidos por meio de biopsia, em pacientes diabéticos com DRC quando comparado à diabéticos sem DRC ou à indivíduos saudáveis (NAZRATUN *et al.*, 2006). Em outro estudo, foi relatado que níveis elevados de AGEs no soro está associado com rigidez arterial em pacientes diabéticos tipo 1 e 2 (ZHOU *et al.*, 2010). Sun *et al.* (2011) demonstraram que o CML e a pentosidina estão fortemente associados a diabetes, levando a retinopatia (SUN *et al.*, 2011). Quanto maior é o nível de AGEs na circulação maior é a probabilidade de desenvolvimento de complicações vasculares da diabetes (BANSAL *et al.*, 2013a; GENUTH *et al.*, 2009). Em um estudo utilizando anéis de aorta de coelho *in vitro*, tratadas com AGEs houve a inibição da vasodilatação e a indução de respostas inflamatórias (XU *et al.*, 2003). Rempel *et al.* (2015) demonstraram que os AGEs induzem a expressão de RAGE levando a ativação da via PKC- $\beta$  em células endoteliais humanas (REMPEL *et al.*, 2015). Com efeito, a interação de AGEs-RAGE ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B que, por sua vez, conduz a expressão do gene e a liberação de moléculas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 $\alpha$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (STINGHEN *et al.*, 2015). Nesse panorama, há um interesse crescente dos pesquisadores em desenvolver maneiras de minimizar os efeitos deletérios das toxinas urêmicas tais como os AGEs.

Por meio do ensaio de MTT, observamos que a viabilidade das células endoteliais tratadas com AGEs (0,2 mg/mL) se manteve próximo aos 100%, em relação ao controle, evidenciando que AGEs e BSA não danificam a estrutura e integridade dessas células na concentração utilizada. De forma semelhante, estudo realizado por Rempel *et al.* (2015) utilizando as mesmas células tratadas com AGEs

não tiveram sua viabilidade alterada, corroborando com nossos achados (REMPEL *et al.*, 2015). De forma oposta, as células endoteliais expostas a altas concentrações de AGEs reduz significativamente a viabilidade celular avaliado pelo mesmo ensaio (CHEN *et al.*, 2015). De fato, Yang *et al.* (2015) demonstraram diminuição significativa na viabilidade celular em condrócitos incubados com AGEs (200µg/mL) após 48h de tratamento (YANG *et al.*, 2015). Esses achados sugerem que altas concentrações de AGEs pode reduzir a viabilidade celular.

Nossos dados demonstraram por meio do ensaio de RMN, em amostras contendo 4mM de Pi um aumento desse íon, mas em contraste, quando adicionado 4 mM de Pi na presença de Sevelamer (3%) houve uma redução na concentração desse íon. Corroborando com nossos achados, um estudo recente conduzido por Six *et al.* (2012), em células de aorta de camundongo, tratadas com 3 mM de Pi na presença ou ausência do Sevelamer, demonstrou que as células expostas ao Sevelamer não sofreram danos, ao contrário das que foram incubadas sem o Sevelamer (SIX *et al.*, 2012), confirmando a capacidade desse quelante em se ligar ao Pi *in vitro*. Coppolino *et al.* (2015) avaliaram o efeito desse quelante *in vitro* em amostras contendo Pi. Os autores demonstraram que o Sevelamer é eficiente em quelar Pi por meio de troca de prótons com ânions Pi (COPPOLINO *et al.*, 2015). Em estudo realizado em 148 pacientes com DRC utilizando Sevelamer, observou-se que o sevelamer mostrou-se eficaz em reduzir níveis séricos e urinários de Pi (BLOCK *et al.*, 2012). Além desses estudos, outros descritos na literatura corroboraram com os nossos achados (CHERTOW; BURKE; RAGGI, 2002).

Nossos resultados pelo ensaio de imunocitoquímica, demonstraram o aumento da presença de RAGE aderido na superfície das células endoteliais humanas após tratamento com AGEs. Para confirmar o achado acima foi realizado o ensaio de *Western blot* que demonstrou um maior aumento da expressão de RAGE. Corroborando com os nossos resultados, Chawla *et al.* (2014) relataram que o acúmulo de AGEs na circulação sistêmica de pacientes diabéticos induz ao aumento da expressão de RAGE (CHAWLA *et al.*, 2014). Contudo, houve redução na expressão de RAGE após as células serem tratadas com Sevelamer. Este achado sugere que esse quelante pode atuar se ligando *in vitro* aos AGEs de forma inespecífica e, conseqüentemente, reduzindo a expressão de RAGE. Dados similares foram observados no estudo de Yubero-Serrano *et al.* (2015) em pacientes

com diabetes mellitus tipo 2, no qual o Sevelamer reduziu níveis circulantes de AGEs (YUBERO-SERRANO *et al.*, 2015).

A interação dos AGEs com seu receptor RAGE sobre a superfície endotelial conduz a transdução de várias vias de sinalização, tais como a NADPH oxidase e GTPase. Essa ativação induz a um aumento de ROS, diminuição da biodisponibilidade de NO e apoptose de pericitos (HIGASHI *et al.*, 2009). Ainda, induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$ , IL-6 e proteína C reativa (NEDIĆ *et al.*, 2013). Kerkeni *et al.* (2013) relataram em um estudo envolvendo pacientes com diabetes tipo 2, que os níveis de AGEs, sRAGE e pentosidina estavam elevados em comparação com os pacientes saudáveis. Os autores, ainda, verificaram que esses compostos estão associados positivamente com danos microvascular nesses mesmos pacientes (KERKENI *et al.*, 2013). Yang *et al.* (2014), demonstraram que os AGEs induz a apoptose em cultura de condrócitos de coelhos (YANG *et al.*, 2014).

Os RAGEs também existem na forma solúvel (sRAGE), o qual desempenha vários efeitos deletérios no organismo (COLHOUN *et al.*, 2011). Alguns trabalhos têm demonstrado uma correlação entre os níveis elevados de sRAGE com a progressão da DCV (MARUTHUR *et al.*, 2015). Ademais, níveis aumentados na circulação de sRAGE estão associados com elevação de marcadores inflamatórios e rigidez arterial (BONETTI *et al.*, 2013). Rebholz *et al.* (2014) relataram que níveis elevados de sRAGE está relacionado com um mal prognóstico da função renal, podendo ser considerados fator de risco para o desenvolvimento de doença renal (REBHOLZ *et al.*, 2014).

A IL-8 é uma interleucina expressa por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, célula muscular lisa, bem como pelas células endoteliais (APOSTOLAKIS *et al.*, 2009; LIU; DAI; ZHOU, 2015; SANACORA *et al.*, 2015). É um quimiotático de neutrófilos por excelência, desempenhando vários efeitos biológicos no organismo. Os neutrófilos, por sua vez, interagem com o endotélio no local da lesão e iniciam uma cascata pró-inflamatória, recrutando mais células de defesa (GIORDANO *et al.*, 2016). A regulação da transcrição dessa interleucina é modulada principalmente pelo fator de transcrição NF-kB (GALES *et al.*, 2013). Xie *et al.* (2015) observaram que altas concentrações de IL-8 induzem a angiogênese em modelo

animal com infarto agudo do miocárdio (XIE *et al.*, 2015). Zhu *et al.* (2015) demonstraram que a IL-8 promove *in vitro* a angiogênese tumoral em hepatócitos. Os autores relataram também que neutralizando o efeito dessa interleucina há uma redução na angiogênese (ZHU *et al.*, 2015).

No que se refere à produção de IL-8, nosso estudo demonstrou que as células endoteliais expostas aos AGEs aumentaram significativamente a expressão dessa interleucina. Confirmando nossos achados, Ribeiro *et al.* (2014) observaram em células endoteliais incubadas com soro urêmico um aumento na expressão de IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 2014). Ainda, demonstramos nessas mesmas células tratadas com AGEs, que o Sevelamer foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão de IL-8 para todos os tratamentos quando comparado ao controle. Curiosamente, apesar da associação dessa interleucina com a inflamação, no recrutamento de células de defesa para o local da lesão e na aterogênese (ALLEN; KURDOWSKA, 2013), um efeito protetor tem sido descrito em vários estudos avaliando a adesão de neutrófilos em células endoteliais (TEDGUI *et al.*, 2006). Gimbrone *et al.* (1989) mostraram *in vitro* que a IL-8 inibe a adesão de neutrófilos em células endoteliais e protege essas células de danos mediados por neutrófilos (GIMBRONE *et al.*, 1989). Estudos realizados por Hastings *et al.* (2009) descreveram que a IL-8 reduz a expressão de VCAM-1 em célula endotelial e célula muscular lisa, com consequente menor adesão de monócitos ao local da inflamação (HASTINGS *et al.*, 2009). Simonet *et al.* (1994) relataram que migração neutrofílica para cavidade peritoneal em camundongos transgênicos foi significativamente reduzida após estímulo inflamatório, mostrando níveis elevados de IL-8 (SIMONET *et al.*, 1994). Para tanto, o ensaio de migração celular foi realizado com o intuito de confirmar o efeito do Sevelamer na indução da quimiotaxia sobre monócitos, no qual se verificou um decréscimo na migração na presença desse quelante. Evidenciou-se, ainda, um aumento significativo na migração nas amostras contendo AGEs, sugerindo que essa toxina atua induzindo a expressão de citocinas responsáveis pelo recrutamento de monócitos. Esses achados corroboram com os estudos presentes na literatura (BANSAL *et al.*, 2013b; FIGAROLA *et al.*, 2007).

Com base nos estudos citados, acredita-se que o Sevelamer atua protegendo o endotélio vascular de forma indireta, ou seja, aumentando a expressão de IL-8 e assim reduzindo a inflamação. No que se refere ao Sevelamer, ele pode atenuar a



inflamação sistêmica em pacientes com DRC, à medida que reduz os níveis circulantes de toxinas urêmicas, tais como *p*-cresol e AGEs; e também marcadores inflamatórios como o TNF $\alpha$  (GUIDA *et al.*, 2013; HAUSER *et al.*, 2010). Dois estudos clínicos de um mesmo grupo que avaliaram os efeitos do Sevelamer em 212 pacientes com DRC em estágio 3-4 e em 466 pacientes em hemodiálise sugeriram um efeito favorável deste quelante sobre a mortalidade geral (DI IORIO; BELLASI; RUSSO, 2012; DI IORIO *et al.*, 2013). Em estudo clínico realizado por Block *et al.* (2005) avaliou-se a eficácia do Sevelamer em comparação ao carbonato de cálcio. Os autores relataram uma diminuição na progressão da calcificação da artéria coronária em pacientes em hemodiálise após 18 meses de tratamento com Sevelamer em relação ao carbonato de cálcio (BLOCK *et al.*, 2005b). Outro estudo conduzido por Block *et al.* (2007) demonstraram a associação do Sevelamer com aumento da sobrevida dos pacientes em hemodiálise (BLOCK *et al.*, 2007), além disso, o Sevelamer contribuiu para diminuição do colesterol LDL, aumento de HDL, redução dos níveis de ROS e ácido úrico (IIMORI *et al.*, 2012; TZANAKIS *et al.*, 2014). Guida *et al.* (2013) relataram em um estudo envolvendo pacientes com DRC em diálise peritoneal que o uso de Sevelamer se associou à um menor nível sérico de *p*-cresol e de proteína C reativa em comparação aos que não utilizaram o quelante (GUIDA *et al.*, 2013). Maizel *et al.* (2013) demonstraram, em camundongos com DRC, que o Sevelamer levou a melhoria da rigidez da aorta, da disfunção diastólica e da hipertrofia ventricular esquerda, efeitos possivelmente relacionados à redução da concentração de Pi assim como de outras toxinas urêmicas (MAIZEL *et al.*, 2013).

A avaliação *in vitro* do efeito do Sevelamer em células endoteliais é um estudo inédito, no qual propôs avaliar o efeito pleiotrópico deste quelante sobre os AGEs. Entretanto, o presente estudo apresentou limitações. Não foi possível demonstrar o efeito *in vitro* do Sevelamer como quelante de AGEs por meio da técnica de RMN. Por esse motivo, utilizamos os biomarcadores (IL-8 e RAGE) como uma forma de avaliar indiretamente a ação desse quelante na inflamação mediada pelos AGEs. Uma outra dificuldade foi à utilização do Sevelamer em meio de cultura por se tratar de um polímero insolúvel. Os resultados obtidos abrem novas perspectivas terapêuticas, por representar uma forma complementar e não tóxica para diminuir os níveis circulantes de toxinas, no caso AGEs, nos pacientes com

DRC, ou até mesmo nos pacientes diabéticos sem DRC. Outros ensaios estão sendo realizados na continuidade deste projeto visando confirmar o efeito protetor do Sevelamer na inflamação celular mediada pelos AGEs. Experimentos adicionais serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito *in vitro* do Sevelamer.

## 8 CONCLUSÕES

- A síntese e caracterização de AGEs e BSA foi executada com êxito e os produtos finais mostraram-se adequados para a realização dos tratamentos celulares;
- Não houve diminuição na viabilidade celular após o tratamento com BSA e AGEs quando comparado ao grupo controle na concentração utilizada;
- Observou-se por meio da RMN uma redução da concentração de Pi nas amostras contendo Sevelamer, demonstrando a manutenção da ação desse quelante *in vitro*;
- Após 24h de tratamento com AGEs, observou-se uma maior expressão de RAGE em células endoteliais, que foi diminuída após o tratamento contendo Sevelamer;
- As células endoteliais expostas aos AGEs demonstraram um aumento significativo na produção de IL-8 de forma tempo-dependente quando comparado ao controle. Este aumento foi ainda mais significativo após tratamento das células endoteliais com AGEs e Sevelamer.
- De acordo com o ensaio de migração celular, é possível concluir que o sobrenadante de células endoteliais após tratamento com AGEs em uma cinética de 6h, teve a habilidade de induzir a quimiotaxia de monócitos, que foi diminuída após o tratamento com Sevelamer.

## 9 ENSAIOS ADICIONAIS

O ensaio de múltiplas citocinas (*Adipokine Human Magnetic 14-Plex Panel for Luminex Platform*), por meio da técnica de multiplex Luminex (Massachusetts, EUA) será executado para melhor entendimento do papel da IL-8 e dos resultados obtidos para a complementação da dissertação, com posterior submissão do manuscrito a periódico da área, previsto para o primeiro semestre de 2016.

## REFERÊNCIAS

AGALOU, S. *et al.* Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis. **Biochemical Society transactions**, v. 31, n. Pt 6, p. 1394–6, 2003.

ALHAMDANI, M. S. S.; AL-AZZAWIE, H. F.; ABBAS, F. K. H. Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. **Peritoneal Dialysis International**, v. 27, n. 1, p. 86–89, 2007.

ALLEN, T. C.; KURDOWSKA, A. Interleukin 8 and Acute Lung Injury. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 138, n. February, 2013.

APOSTOLAKIS, S. *et al.* Interleukin 8 and cardiovascular disease. p. 353–360, 2009.

ARSOV, S. *et al.* Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 52, n. 1, p. 1–10, 2013.

ASMUS, H. G. *et al.* Two year comparison of sevelamer and calcium carbonate effects on cardiovascular calcification and bone density. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 8, p. 1653–1661, 2005.

BANSAL, S. *et al.* A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 1-2, p. 109–114, 2013a.

BANSAL, S. *et al.* Association of RAGE gene polymorphism with circulating AGEs level and paraoxonase activity in relation to macro-vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients. **Gene**, v. 526, n. 2, p. 325–330, 2013b.

BARAGETTI, I. *et al.* Role of vitamin E-coated membrane in reducing advanced glycation end products in hemodialysis patients: A pilot study. **Blood Purification**, v. 24, p. 369–376, 2006.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais

da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.

BARRETO, F. C. *et al.* The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 221–235, 2014.

BERMÚDEZ, R. M. *et al.* Documento de Consenso. Recomendaciones sobre la valoración de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. **Nefrologia**, v. 31, n. 3, p. 331–345, 2011.

BLOCK, G. A. *et al.* Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1815–1824, 2005a.

BLOCK, G. A. *et al.* Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. **Kidney International**, v. 68, n. 4, p. 1815–1824, 2005b.

BLOCK, G. A. *et al.* Mortality effect of coronary calcification and phosphate binder choice in incident hemodialysis patients. **Kidney Int.**, v. 71, n. 0085-2538 (Print), p. 438–441, 2007.

BLOCK, G. A. *et al.* Effects of Phosphate Binders in Moderate CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1407–1415, 2012.

BODIGA, V. L.; EDA, S. R.; BODIGA, S. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy. **Heart Failure Reviews**, p. 1–15, 2013.

BONETTI, T. C. S. *et al.* Intrafollicular soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and embryo quality in assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, n. 1, p. 62–67, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BUCALA, R. Diabetes, aging, and their tissue complications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 5, p. 1887–1888, 2014.

CAMPBELL, L.; MAXWELL, P.; WAUGH, D. **Rationale and Means to Target Pro-Inflammatory Interleukin-8 (CXCL8) Signaling in Cancer**. [s.l: s.n.]. v. 6

CHARMOT. Non-Systemic Drugs: A Critical Review. **Current Pharmaceutical Design**, p. 1434–1445, 2012.

CHAWLA, D. *et al.* Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. **Microvascular research**, v. 95, p. 1–6, 2014.

CHEN, Y. *et al.* Paeoniflorin protects HUVECs from AGE-BSA-induced injury via an autophagic pathway by acting on the RAGE. v. 8, n. 1, p. 53–62, 2015.

CHERTOW, G. M.; BURKE, S. K.; RAGGI, P. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p. 245–252, 2002.

COLHOUN, H. M. *et al.* Total Soluble and Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products as Predictive Biomarkers of Coronary Heart Disease Risk in Patients With Type 2 Diabetes: An Analysis From the CARDS Trial. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2379–2385, 2011.

COPPOLINO, G. *et al.* Sevelamer Hydrochloride, Sevelamer Carbonate and Lanthanum Carbonate: In Vitro and In Vivo Effects on Gastric Environment. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, n. 9, p. n/a–n/a, 2015.

DI IORIO, B. *et al.* Sevelamer versus calcium carbonate in incident hemodialysis patients: Results of an open-label 24-month randomized clinical trial. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 62, n. 4, p. 771–778, 2013.

DI IORIO, B.; BELLASI, A.; RUSSO, D. Mortality in Kidney Disease Patients Treated with Phosphate Binders: A Randomized Study. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 3, p. 487–493, 2012.

DIAZ-BUXO, J. A.; WOODS, H. F. Protecting the endothelium : A new focus for

management of chronic kidney disease. p. 42–48, 2006.

ECKARDT, K.-U. *et al.* Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. **The Lancet**, v. 382, n. 9887, p. 158–169, 2013.

EDGEELL, C. J.; MCDONALD, C. C.; GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3734–3737, 1983.

EL NAHAS, M. Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept. **Kidney international**, v. 78, n. 1, p. 14–18, 2010.

FIGAROLA, J. L. *et al.* Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 647–655, 2007.

FLOEGE, J. Phosphate binders in chronic kidney disease: a systematic review of recent data. **Journal of Nephrology**, 2016.

FUJII, H. *et al.* Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 7, p. 2089–2095, 2009.

GALES, D. *et al.* The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. **ISRN oncology**, v. 2013, p. 859154, 2013.

GANSEVOORT, R. T. *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. **The Lancet**, v. 382, n. 9889, p. 339–352, 2013.

GENUTH, S. *et al.* NIH Public Access. v. 130, n. 29, p. 9492–9499, 2009.

GIMBRONE, M. A. *et al.* Endothelial Interleukin-8 : A Novel Inhibitor of Leukocyte-Endothelial Interactions. n. 10, p. 2–4, 1989.

GIORDANO, S. *et al.* Targeted Delivery of Human iPS-ECs Overexpressing IL-8



Receptors Inhibits Neointimal and Inflammatory Responses to Vascular Injury in the Rat. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, n. 205, p. ajpheart.00587.2015, 2016.

GLASSOCK, R. J. Uremic Toxins: What Are They? An Integrated Overview of Pathobiology and Classification. **Journal of Renal Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 2–6, 2008.

GOLDBERG, T. *et al.* Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1287–1291, 2004.

GOLDIN, A. *et al.* Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597–605, 2006.

GUIDA, B. *et al.* Plasma p-Cresol Lowering Effect of Sevelamer in Peritoneal Dialysis Patients: Evidence from a Cross-Sectional Observational Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

GÜNTNER, T. *et al.* Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 4, p. 428–432, 2009.

HASTINGS, N. E. *et al.* Human IL-8 regulates smooth muscle cell VCAM-1 expression in response to endothelial cells exposed to atheroprone flow. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 5, p. 725–731, 2009.

HAUSER, A. B. *et al.* Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. **Blood Purification**, v. 30, n. 3, p. 153–158, 2010.

HEGAB, Z. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. **World Journal of Cardiology**, v. 4, n. 4, p. 90, 2012.

HIGASHI, Y. *et al.* Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circ J**, v. 73, n. March, p. 411–418, 2009.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 6, p. 636–643, 2009.

HUEBSCHMANN, A. G. *et al.* Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420–1432, 2006.

IIMORI, S. *et al.* Effects of sevelamer hydrochloride on mortality, lipid abnormality and arterial stiffness in hemodialyzed patients: a propensity-matched observational study. **Clinical and experimental nephrology**, v. 16, n. 6, p. 930–7, 2012.

INAMI, Y. *et al.* Effect of AST-120 on Endothelial Dysfunction in Adenine-Induced Uremic Rats. **International Journal of Nephrology**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

INKER, L. A. *et al.* KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 63, n. 5, p. 713–35, 2014.

JAIPERSAD, A. S. *et al.* The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 1, p. 1–11, 2014.

JOURDE-CHICHE, N. *et al.* Vascular Incompetence in Dialysis Patients-Protein-Bound Uremic Toxins and Endothelial Dysfunction. **Seminars in Dialysis**, v. 24, n. 3, p. 327–337, 2011.

JUNDI, K.; GREENE, C. M. Transcription of Interleukin-8: How Altered Regulation Can Affect Cystic Fibrosis Lung Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1386–1398, 2015.

KAKUTA, T. *et al.* Effect of sevelamer and calcium-based phosphate binders on coronary artery calcification and accumulation of circulating advanced glycation end products in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 57, n. 3, p. 422–431, 2011.

KDIGO. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 1, p. 4–4, 2013.

KERKENI, M. *et al.* Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease**, v. 10, n. 3, p. 239–

45, 2013.

LEAVESLEY, D. I. *et al.* Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. **The Journal of cell biology**, v. 121, n. 1, p. 163–170, 1993.

LEVEY, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of internal medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–12, 2009.

LI, A. C.; GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nature medicine**, v. 8, n. 11, p. 1235–1242, 2002.

LI, Y. H.; ZHU, C. A modified Boyden chamber assay for tumor cell transendothelial migration in vitro. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, n. 5, p. 423–429, 1999.

LIN, C. L. *et al.* Reduction of advanced glycation end product levels by on-line hemodiafiltration in long-term hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, n. 3, p. 524–531, 2003.

LIN, H.-H. *et al.* Long-term sevelamer treatment lowers serum fibroblast growth factor 23 accompanied with increasing serum Klotho levels in chronic haemodialysis patients. **Nephrology**, v. 19, n. 11, p. 672–678, 2014.

LIU, X.; DAI, L.; ZHOU, R. Association between preeclampsia and the CXC chemokine family (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, n. 20, p. 1572–1576, 2015.

MAIZEL, J. *et al.* Effects of sevelamer treatment on cardiovascular abnormalities in mice with chronic renal failure. **Kidney International**, v. 84, n. 3, p. 491–500, 2013.

MARCOVECCHIO, M. L.; LUCANTONI, M.; CHIARELLI, F. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. **Diabetes technology & therapeutics**, v. 13, n. 3, p. 389–394, 2011.

MARUTHUR, N. M. *et al.* Genetics of Plasma Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Cardiovascular Outcomes in a Community-based Population: Results from the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Plos One**,

v. 10, n. 6, p. e0128452, 2015.

MEADE, S. J.; MILLER, A. G.; GERRARD, J. A. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 6, p. 853–62, 2003.

MEERWALDT, R. *et al.* Accumulation of Advanced Glycation End Products and Chronic Complications in ESRD Treated by Dialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 53, n. 1, p. 138–150, 2009.

MEIJERS, B. K. I. *et al.* p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 7, p. 1182–1189, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAZRATUN, N. *et al.* Diabetes mellitus exacerbates advanced glycation end product accumulation in the veins of end-stage renal failure patients. p. 245–250, 2006.

NEDIĆ, O. *et al.* Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. **Free radical research**, v. 47 Suppl 1, n. August, p. 28–38, 2013.

OLIVEIRA, R. B. DE *et al.* Vascular calcification in chronic kidney disease. **Recenti progressi in medicina**, v. 101, n. 11, p. 442–452, 2010a.

OLIVEIRA, M. I. A. *et al.* RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, p. 97–108, 2013.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Early control of PTH and FGF23 in normophosphatemic CKD patients: A new target in CKD-MBD therapy? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 2, p. 286–291, 2010b.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PERRETTI, M. *et al.* Annexin 1 modulates monocyte-endothelial cell interaction in vitro and cell migration in vivo in the human SCID mouse transplantation model. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 4, p. 2085–2092, 2002.

PIERCE, D. *et al.* The effect of sevelamer carbonate and lanthanum carbonate on the pharmacokinetics of oral calcitriol. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 26, n. 5, p. 1615–21, 2011.

PIRODDI, M. *et al.* Nondialyzable uremic toxins. **Blood Purification**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 30–41, 2013.

POLJICANIN, A. *et al.* Expression pattern of RAGE and IGF-1 in the human fetal ovary and ovarian serous carcinoma. **Acta histochemica**, n. FEBRUARY, p. 1–9, 2015.

PONGOR, S. *et al.* Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2684–2688, 1984.

PRESIBELLA, M.M. O efeito de extratos de plantas medicinais na quimiotaxia leucocitária *in vitro*. 2003.114f. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, 2003.

REBHOLZ, C. M. *et al.* Association of plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and risk of kidney disease: the Atherosclerosis Risk in Communities study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 1, p. 77–83, 2014.

REMPEL, L. C. T. *et al.* Effect of PKC- $\beta$  Signaling Pathway on Expression of MCP-1 and VCAM-1 in Different Cell Models in Response to Advanced Glycation End Products (AGEs). p. 1722–1737, 2015.

RIBEIRO, V. *et al.* Uremic serum inhibits in vitro expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 123–131, 2014.

ROJAS, A. *et al.* Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by

Albumin-Derived Advanced Glycosylation End Products. **Circulation Research** , v. 86 , n. 3 , p. e50–e54, 2000.

SANACORA, S. *et al.* Anticancer drug bortezomib increases interleukin-8 expression in human monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, n. March, p. 1–5, 2015.

SANDU, O. *et al.* Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in High-Fat – Fed Mice Are Linked to High Glycotoxin Intake. v. 54, n. August, 2005.

SAVICA, V. *et al.* Salivary phosphate-binding chewing gum reduces hyperphosphatemia in dialysis patients. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 20, n. 3, p. 639–644, 2009.

SCHULMAN, G.; VANHOLDER, R.; NIWA, T. AST-120 for the management of progression of chronic kidney disease. **International journal of nephrology and renovascular disease**, v. 7, p. 49–56, 2014.

SEGAL, M. S.; BAYLIS, C.; JOHNSON, R. J. Endothelial health and diversity in the kidney. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 17, n. 2, p. 323–324, 2006.

SELVIN, E. *et al.* SRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 2116–2121, 2013.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 65 A, n. 9, p. 963–975, 2010.

SESSO, R. C. *et al.* Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 1, p. 48–53, 2014.

SIMONET, W. S. *et al.* Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1310–1319, 1994.

SIX, I. *et al.* Effects of phosphate on vascular function under normal conditions and

influence of the uraemic state. **Cardiovascular Research**, v. 96, n. 1, p. 130–139, 2012.

STINGHEN, A. E. M. *et al.* Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron - Clinical Practice**, v. 111, n. 2, p. 117–126, 2009.

STINGHEN, A. E. M. *et al.* Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. p. 1–20, 2015.

STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. **International journal of hypertension**, v. 2011, n. i, p. 232683, 2011.

SUN, J. K. *et al.* Protection From Retinopathy and Other Complications in Patients With Type 1 Diabetes of Extreme Duration: The Joslin 50-Year Medalist Study. **Diabetes Care**, v. 34, n. 4, p. 968–974, 2011.

SUSANTITAPHONG, P.; SIRIBAMRUNGWONG, M.; JABER, B. L. Convective therapies versus low-flux hemodialysis for chronic kidney failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 28, n. 11, p. 2859–74, 2013.

TAM, X. H. L. *et al.* Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 120, n. 2, p. 81–9, 2011.

TANG, K. H. *et al.* CD133+ liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 807–820, 2012.

TEDGUI, A. *et al.* Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. p. 515–581, 2006.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N. Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 4, p. 400–404, 2009.

TZANAKIS, I. P. *et al.* Magnesium retards the progress of the arterial calcifications in hemodialysis patients: a pilot study. **International urology and nephrology**, v. 46, n. 11, p. 2199–2205, 2014.

UEDA, H. *et al.* AST-120, an oral adsorbent, delays the initiation of dialysis in patients with chronic kidney diseases. **Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy**, v. 11, n. 3, p. 189–95, 2007.

URIBARRI, J. Restriction of Dietary Glycotoxins Reduces Excessive Advanced Glycation End Products in Renal Failure Patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 3, p. 728–731, 2003.

VANHOLDER, R. *et al.* The role of EUTox in uremic toxin research. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 4, p. 323–328, 2009.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211–1221, 2008.

VLASSARA, H. *et al.* Managing chronic inflammation in the aging diabetic patient with CKD by diet or sevelamer carbonate: A modern paradigm shift. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 12, p. 1410–1416, 2012a.

VLASSARA, H. *et al.* Effects of sevelamer on HbA1c, inflammation, and advanced glycation end products in diabetic kidney disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 934–942, 2012b.

WANG, C. *et al.* Skin Autofluorescence Is Associated with Endothelial Dysfunction in Uremic Subjects on Hemodialysis. p. 1–14, 2016.

WEBER, C. Chemokines: Key Regulators of Mononuclear Cell Recruitment in Atherosclerotic Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 11, p. 1997–2008, 2004.

XIE, Q. *et al.* IL-8 up-regulates proliferative angiogenesis in ischemic myocardium in rabbits through phosphorylation of Akt / GSK-3 $\beta$  ser9 dependent pathways. v. 8, n. 8, p. 12498–12508, 2015.



XU, B. *et al.* Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. n. 3, 2003.

XU, Y. *et al.* Blockade of PKC-beta protects HUVEC from advanced glycation end products induced inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 12, p. 1552–1559, 2010.

YAMAMOTO, S. *et al.* Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates extent and instability of atherosclerosis accelerated by kidney disease in apolipoprotein E-deficient mice. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 8, p. 2491–2497, 2011.

YANG, Q. *et al.* Advanced glycation end products-induced chondrocyte apoptosis through mitochondrial dysfunction in cultured rabbit chondrocyte. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 54–61, 2015.

YANG, W. *et al.* Association of kidney disease outcomes with risk Factors for CKD: Findings from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 2, p. 236–243, 2014.

YUBERO-SERRANO, E. M. *et al.* Effects of Sevelamer Carbonate on Advanced Glycation End Products and Antioxidant/Pro-Oxidant Status in Patients with Diabetic Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, n. 14, p. 1–8, 2015.

ZHOU, Y. *et al.* Association of serum pentosidine with arterial stiffness in hemodialysis patients. **Artificial organs**, v. 34, n. 3, p. 193–199, 2010.

ZHU, B. *et al.* Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis via interleukin-8 in hepatocellular carcinoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 365, 2015.

ZIEMAN, S. J.; KASS, D. A. Advanced Glycation End Product Cross-Linking: Pathophysiologic Role and Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. **Congestive Heart Failure**, v. 10, n. 3, p. 144–151, 2004.

ZOCCALI, C.; MALLAMACI, F.; CANNATA-ANDÍA, J. Phosphate Binders and Clinical Outcomes in Patients with Stage 5D Chronic Kidney Disease. **Seminars in Dialysis**, v. 28, n. 6, p. 587–593, 2015.

## APÊNDICE

### PRODUÇÃO RELACIONADA AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO:

1. Apresentação de trabalho: Avaliação da Captação de *p*-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Trasnporters* (OATS). Londres: Oxford: Oxford Journals, 2015, v. v. 30. p. p. 1-p. 1.
2. Apresentação de trabalho: Avaliação da Captação de *p*-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Trasnporters* (OATS). VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.
3. Resumo publicado em anais de congresso: *p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells trough organic anion transporters*. In: 52ND ERA-EDTA CONGRESS, 2015, Londres. *p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells trough organic anion transporters*. Londres: Oxford: Oxford Journals, 2015, v. v. 30. p. p. 1-p. 1.
4. Trabalhos publicados em anais de evento (completo): A Importância do Diagnóstico de Dismorfismo Eritrocitário na Hematúria. Evento de Iniciação Científica do Centro Universitário Autônomo do Brasil 2015, Curitiba.
5. Resumo publicado em formato de pôster: Avaliação da Captação de *p*-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Trasnporters* (OATS), 2015.

Participação em eventos:

- VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.
- Simpósio de toxicidade Urêmica no VI congresso Sul Brasileiro de Nefrologia, 2015.
- 2ª Mostra anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas “Ciência no Espelho”, 2015.
- Segundo Simpósio de Toxicidade urêmica, PUCPR, 2015.
- Curso de Glomerulopatias (PUCPR), 2014.
- XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia e VI Simpósio Luso-Brasileiro de Nefrologia, 2014.
- Curso Pré-Congresso (CBN): Pesquisa Básica - Toxicidade Urêmica e complicações da Doença Renal Crônica, 2014.
- Curso Pré-Congresso (CBN): Encontro Nacional de Prevenção da Doença Renal Crônica- Política e multidisciplinariedade, 2014.

Demais produções técnicas:

- Participação como palestrante do minicurso intitulado “cultivo celular” na VIII jornada do curso de biomedicina e semana de iniciação científica do UniBrasil – EVINCI (2015).

## ANEXOS

### ANEXOS I

(Trabalho submetido)

#### **Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-bound**

#### **Uremic Toxins by Human Endothelial Cells**

Giane Favretto<sup>1</sup>, Lauro M. Souza<sup>2,3</sup>, Paulo C. Gregório<sup>1</sup>, Regiane S. Cunha<sup>1</sup>, Alessandra B. Finco<sup>1</sup>, Guilherme L. Sassaki<sup>2</sup>, Maria G. Toledo<sup>4</sup>, Roberto Pecoits-Filho<sup>5</sup>, Wesley M. Souza<sup>6</sup>, Andréa E. Stinghen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

<sup>2</sup>*Biochemistry Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

<sup>3</sup>*Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Pequeno Príncipe Complex, 80250-200, Curitiba, PR, Brazil.*

<sup>4</sup>*Farmacy Departament, Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.*

<sup>5</sup>*School of Medicine - CCBS, Pontificia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, PR, Brazil.*

<sup>6</sup>*Bacteriology and Molecular Biology Laboratory, Clinical Analysis Department Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.*

#### **Highlights:**

- OAT1 and OAT3 overexpression in human endothelial cells after PCS and IS treatment
- PCS is more actively internalized by endothelial cells than IS
- Blockage of OATs decreases MCP-1 expression after PCS and IS treatment

\*Corresponding author: Andréa E. Stinghen, Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Mail Box 19031, Centro Politécnico, Jardim das Américas, CEP 80531-98, Curitiba, Paraná (Brazil). Tel. +55-41-32611691.

## ANEXOS II

(Trabalho aceito para publicação)

ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT EM CELULAS TRATADAS COM  
TOXINAS URÊMICAS - REVISÃO  
CELL VIABILITY ANALYSIS BY MTT IN CELLS TREATED WITH UREMIC TOXINS -  
REVIEW

Kariman Assis Bochnie <sup>1</sup>Paulo César Gregório <sup>2</sup>Rayana Ariane Pereira Maciel <sup>3</sup>

**Resumo:** A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por um período igual ou superior a 3 meses, com anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). A DRC é classificada em estágios iniciais (estágio 1), leves (estágios 2 e 3a), moderados (estágio 3b), função renal severamente diminuída (estágio 4) e insuficiência renal (estágio 5). Com a permanência da doença, os rins perdem a capacidade parcial ou total de remoção de metabólitos tóxicos da circulação, tais como *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS), que comumente seriam excretados para formação da urina, o que resulta no acúmulo destes no organismo. Este quadro é denominado uremia ou toxicidade urêmica. Para avaliação *in vitro* da toxicidade de alguns compostos urêmicos, utiliza-se técnicas laboratoriais, como o ensaio de viabilidade celular por MTT. O objetivo desse estudo é explanar sobre uma das técnicas *in vitro* de citotoxicidade - ensaio de viabilidade celular por MTT - em células tratadas com toxinas urêmicas.

**Descritores:** Doença renal crônica; toxicidade urêmica; viabilidade celular.

**Abstract:** Chronic Kidney Disease (CKD) is defined as the presence of kidney damage for a period equal to or exceeding 3 months, structural or functional abnormalities of the kidney, with or without a decreased glomerular filtration rate (GFR). CKD is classified in the early stages (stage 1), mild (stages 2 and 3a), moderate (stage 3b), severely reduced kidney function (stage 4) and renal failure (stage 5). With the persistence of the disease, the kidneys lose their partial capacity or complete removal of toxic metabolites of movement, such as *p*-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS), which usually would be excreted into urine formation, which results in the accumulation of these in the body. This condition is called uremia or uremic toxicity. For *in vitro* evaluation of the toxicity of some uremic compounds, we use laboratory techniques, such as cell viability assay by MTT. The aim of this study is to explain about one of the techniques *in vitro* cytotoxicity - cell viability assay - in cells treated with uremic toxins.

**Keywords:** Chronic kidney disease; uremic toxicity; cell viability.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil).

<sup>2</sup> Farmacêutico-Bioquímico, Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (Universidade Federal do Paraná - UFPR).

<sup>3</sup> Biomédica, Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (Universidade Federal do Paraná - UFPR). Professora do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). rayanaarlane@gmail.com